

Universidad de Sevilla
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

**Plasticidad fisiológica de las células madre
del cuerpo carotídeo adulto: caracterización
del linaje mesectodérmico**

Tesis Doctoral
Elena Navarro Guerrero

Director de Tesis: Dr. Ricardo Pardal Redondo

Sevilla, 2015

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica
Facultad de Medicina
Universidad de Sevilla



Plasticidad fisiológica de las células madre del cuerpo carotídeo adulto: caracterización del linaje mesectodérmico

Elena Navarro Guerrero

Licenciada en Biotecnología

Director de Tesis: Dr. Ricardo Pardal Redondo

Instituto de Biomedicina de Sevilla
CSIC-US-HUVR

Ricardo Pardal Redondo, Profesor del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla, adscrito al Instituto de Biomedicina de Sevilla de Sevilla,

Certifico que:

Elena Navarro Guerrero, Licenciada en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide, ha realizado su Tesis Doctoral titulada “Plasticidad fisiológica de las células madre del cuerpo carotídeo adulto: caracterización del linaje mesectodérmico” bajo mi dirección, en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (CSIC-US-HUVR).

Considero que la presente Tesis Doctoral reúne las condiciones de originalidad y rigor necesarios y se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado,

En Sevilla, a 27 de abril de 2015.

Dr. Ricardo Pardal Redondo
Director de Tesis
Profesor del Departamento de
Fisiología Médica y Biofísica,
Universidad de Sevilla

Agradecimientos

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ricardo Pardal Redondo, por confiar en mí y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Me gustaría agradecer también haber tenido una beca de formación de personal investigador (FPI), otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación en 2010. Agradezco al Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), por haberme permitido realizar este trabajo de tesis doctoral a través de sus instalaciones y sus técnicos especializados. Quiero agradecer a mi grupo por su apoyo y por todo lo que me han enseñado durante estos años, y por supuesto a mi familia. Muchas gracias.

Resumen

Resumen

El cuerpo carotídeo (CB), un órgano quimiosensor derivado de la cresta neural, permite la adaptación a la hipoxia crónica mediante neurogénesis y angiogénesis. Recientemente se ha descrito en nuestro grupo que ambos procesos son resultado de la actividad de una población de células madre neurales que residen en este nicho germinal. Éstas dan lugar a neuroesferas (NS) *in vitro*. Mediante análisis génico por *microarrays* de NS de CB enriquecidas en células indiferenciadas *versus* diferenciadas hemos hallado a la proteína CD10 como un marcador de progenitores de CB.

CD10 es una metaloendopeptidasa que inactiva péptidos señalizadores a través de su dominio catalítico exterior, y paralelamente, interviene en proliferación, diferenciación endotelial y migración gracias a su dominio citoplasmático. La expresión de CD10 en CB co-localiza parcialmente con Nestina y/o GFAP, y los análisis del trazado del linaje celular han confirmado que las células CD10⁺ provienen del linaje de la célula madre del CB (CBSC) GFAP⁺. El aislamiento de células CD10⁺ mediante citometría de flujo incrementa la eficiencia de formación de NS. De manera relevante, los progenitores CD10⁺ se diferencian hacia células de músculo liso (SMA⁺) y células endoteliales (GSA I⁺), pero no se diferencian hacia células neuronales (TH⁺), indicando que los progenitores CD10⁺ están restringidos hacia el linaje mesectodérmico del CB.

Dado que CD10 es un regulador angiogénico en otros tejidos, y la importante angiogénesis que tiene lugar en el CB en hipoxia mantenida, realizamos experimentos funcionales de esta proteína. Estos han revelado que la expresión de CD10 está regulada por la hipoxia en CB, y que CD10 controla la diferenciación endotelial de los progenitores CD10⁺, al menos a través de su actividad catalítica. Uno de los principales sustratos de CD10 es la endotelina-1 (ET-1), que es liberada en el CB en hipoxia. Es una citoquina pro-proliferativa y pro-angiogénica que incrementa el número de células CD10⁺ y los niveles de expresión de CD10 *in vitro*, además mediante análisis génico de *microarrays* hemos visto que ET-1 induce la diferenciación mesectodérmica de las CBSCs. En definitiva, los progenitores CD10⁺, restringidos al linaje mesectodérmico, tras el estímulo hipóxico, ven reducidos los niveles de expresión de CD10, produciéndose la activación de dichos progenitores y su consecuente diferenciación hacia células vasculares, que contribuyen a la angiogénesis que tiene lugar en el órgano en hipoxia crónica.

Resumen en inglés (*Abstract*)

We have described a novel neurogenic niche in the adult carotid body (CB), an oxygen-sensing organ derived from the neural crest that is able to adapt to chronic hypoxemia by increasing the number of chemosensory neuronal cells and vascular cells. These neurogenesis and angiogenesis depend on the activity of a resident population of neural progenitors, which are also able to form neurospheres (NS) in vitro. Gene expression analysis comparing NS cultures enriched in undifferentiated versus differentiated cells displayed CD10 as a candidate marker for CB progenitor cells.

CD10 is a metalloendopeptidase that inactivates signalling peptides, modifying the extracellular environment. In parallel, CD10 protein has an intracellular domain that mediates proliferation, endothelial differentiation and migration processes, by direct protein-protein associations. In the CB, CD10 expression partially co-localizes with Nestin and/or GFAP, and a cell-fate mapping analysis has confirmed that CD10⁺ cells lie within the CB progenitor lineage. Sorting for CD10⁺ cells increases NS-forming efficiency. Interestingly, CD10⁺ progenitors can differentiate into smooth muscle (SMA⁺) or endothelial (GSA I⁺) cells, but are not able to convert into neuronal (TH⁺) cells, indicating a mesectodermal commitment in these cells.

Since a profound angiogenesis occurs in the CB in response to hypoxia and it is described that CD10 is a key regulator of angiogenesis, we have tested whether CD10 is having a role in regulating this process. Our functional study revealed that CD10 protein controls endothelial differentiation of the CD10⁺ progenitor subpopulation, likely through the catalytic activity of CD10. One of the typical molecules cleaved by CD10 is the pro-angiogenic peptide endothelin-1 (ET-1). ET-1 significantly increases CD10 expression and the amount of CD10⁺ cells in vitro, and gene expression analysis shows that ET-1 induces an increase in mesectodermal differentiation of CBSCs. Taking together, our results suggest that GFAP⁺ stem cells give rise to mesectoderm-committed CD10⁺ progenitors, and that CD10 could have a functional role cleaving peptides such as ET-1, regulating the angiogenesis that accompany the neurogenesis suffered in hypoxemia. A deeper knowledge of the molecular mechanisms governing CB progenitor cell fate decisions will improve our understanding of the physiology of this important chemoreceptor organ.

Índice

Índice

Agradecimientos	V
Resumen	VII
Resumen en inglés (<i>Abstract</i>)	IX
Índice.....	11
Clave de Abreviaturas.....	16
Introducción	19
1. El cuerpo carotídeo.....	19
1.1. Fisiología del cuerpo carotídeo.....	19
2. Células madre; aspectos generales.....	22
3. Células madre neurales somáticas; concepto y metodología de estudio.....	24
3.1. Nichos neurogénicos en el sistema nervioso central	26
3.1.1. La zona subventricular	26
3.1.2. La zona subgranular	29
3.2. Células madre de la cresta neural	31
3.3. El cuerpo carotídeo, nicho germinal del sistema nervioso periférico adulto.....	32
4. Células madre del cuerpo carotídeo (CBSCs).....	34
4.1. Mecanismos de proliferación y diferenciación de las CBSCs.....	34
4.2. Progenitores neurales restringidos del cuerpo carotídeo	35
4.3. Origen embrionario de las células madre de cuerpo carotídeo.....	35
4.4. Uso del cuerpo carotídeo en terapia celular.....	38
4.5. Análisis de expresión génica por microarray con células del CB.....	39
5. CD10 o neprilisina	45
5.1. Expresión, isoformas y estructura de CD10	46
5.2. Modificaciones post-traduccionales de CD10	48
5.3. Funciones de CD10.....	48
5.4. Funciones de CD10 descritas en cuerpo carotídeo	50
Objetivos.....	53
Materiales y Métodos	55
1. Animales	55

1.1. Tratamiento de hipoxia crónica mediante cámaras isobáricas.....	55
2. Técnicas histológicas.....	56
2.1. Inclusión de tejidos y corte	56
2.2. Preparación de tejidos frescos	56
3. Cultivos celulares.....	57
3.1. Medios y soluciones	57
3.2. Disección y dispersión de tejidos	58
3.3. Cultivo de CBSCs en condiciones de no adherencia: Ensayo de neuroesferas..	59
3.4. Cultivo de células adherente de células de CB: cultivo del linaje mesectodérmico del CB 60	
4. Técnicas inmunofluorescentes.....	61
4.1. Inmunofluorescencia en secciones de cuerpo carotídeo	61
4.2. Inmunofluorescencia en secciones de neuroesferas.....	62
4.3. Inmunofluorescencia de células dispersas de cuerpo carotídeo.....	62
4.4. Adquisición de imágenes	63
4.5. Cuantificaciones celulares y cuantificación del área de expresión.....	64
4.6. Ensayos funcionales en cultivos de CBSCs.....	64
4.6.1. <i>Determinación de la capacidad proliferativa de las células madre.....</i>	<i>64</i>
4.6.2. <i>Análisis de la diferenciación de las CBSCs.....</i>	<i>65</i>
5. Citometría de flujo.....	66
5.1. Tinción de marcadores de membrana para citometría de flujo.....	67
5.2. Tinción doble, de marcador de membrana y de marcador intracelular, para citometría de flujo.....	67
5.3. Separación de células de cuerpo carotídeo mediante FACS.....	68
6. Análisis de expresión de ARN mensajeros	68
6.1. Extracción de ARN total y retrotranscripción	68
6.2. Reacciones de PCR.....	70
6.3. Análisis de microarrays	71
6.3.1. <i>Cultivos de neuroesferas para la realización del microarray.....</i>	<i>71</i>
6.3.2. <i>Estudio de expresión diferencial de genes.....</i>	<i>71</i>
6.3.3. <i>Validación de los microarrays.....</i>	<i>71</i>
6.3.4. <i>Estudio de las funciones biológicas mediante IPA.....</i>	<i>72</i>
6.4. Transfección de células dispersas de CB con siRNA	72
7. Separación electroforética de proteínas e inmunodetección (Western Blot)	74

7.1. Extracción de proteínas.....	74
7.2. Electroforesis SDS-PAGE, transferencia e inmunodetección	74
8. Análisis estadístico	75
9. Anexos.....	76
9.1. Anticuerpos primarios	76
9.2. Anticuerpos secundarios	77
9.3. Oligonucleótidos.....	78
Resultados.....	81
A. Análisis de expresión génica e identificación de CD10 como marcador de células indiferenciadas de cuerpo carotídeo.....	81
1. Detección y aislamiento de células CD10⁺ en el cuerpo carotídeo	81
1.1. Búsqueda de anticuerpos que reconozcan el marcador CD10 en CB de rata	81
1.2. Detección de células CD10 ⁺ en cuerpo carotídeo mediante citometría de flujo	84
2. Caracterización de las células CD10⁺ de cuerpo carotídeo.....	86
2.1. Inmunodetección de células CD10 ⁺ <i>in vivo</i>	86
2.2. Identificación de las células CD10 ⁺ dentro del linaje germinal del CB	87
B. CD10 define una población de progenitores mesectodérmicos en estado latente, preparados para participar en angiogénesis.....	94
1. Progenitores CD10⁺: aislamiento y caracterización	94
2. Diferenciación de los progenitores CD10⁺	96
3. Línea primaria de cuerpo carotídeo CBA, enriquecida en células CD10⁺	98
C. Los progenitores CD10⁺ se activan ante un estímulo hipóxico.....	103
1. CD10 controla la proliferación de los progenitores CD10⁺	105
2. CD10 controla la diferenciación mesectodérmica de los progenitores CD10⁺.....	107
3. La expresión de CD10 está regulada por hipoxia en el cuerpo carotídeo	109
D. CD10 como mediador del efecto de la endotelina-1 en los progenitores de CB113	
1. La ET-1 provoca un aumento en la proporción de células CD10⁺	113
2. La ET-1 promueve el linaje mesectodérmico del CB	114
3. Análisis del efecto de la ET-1 mediante estudio de expresión génica por microarray.....	117

3.1. Funciones biológicas representadas en los progenitores del cuerpo carotídeo tratados o no con ET-1.....	123
3.2. Rutas de señalización representadas en los progenitores del cuerpo carotídeo tratados o no con ET-1.....	131
Discusión.....	136
1. Linajes celulares del cuerpo carotídeo: plasticidad de las CBSCs.....	136
2. Papel de CD10 en el nicho germinal del cuerpo carotídeo	139
3. La ET-1 activa a los progenitores mesectodérmicos CD10 ⁺ para su diferenciación hacia células vasculares.....	143
4. Aplicaciones en medicina	145
Conclusiones.....	149
Bibliografía.....	152

Clave de abreviaturas

Clave de Abreviaturas

7-AAD	<i>7-Amino-actinomycin D</i>
Amp	Ampicilina
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CB	<i>Carotid body</i> (Cuerpo carotídeo)
CBA	<i>Carotid body adherent</i> (línea de CB cultivada en adherente)
CBSCs	<i>Carotid body stem cells</i> (Células madre de cuerpo carotídeo)
CNS	<i>Central nervous system</i> (Sistema nervioso central)
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
dNTPs	<i>Desoxirribonucleótidos trifosfato</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Proteína verde fluorescente)
DIV	<i>Days in vitro</i>
ET-1	Endotelina-1
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Suero fetal bovino)
FCH	<i>Fold change</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i> (Factor de crecimiento fibroblástico 2 o básico)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (Factor de crecimiento insulínico)
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
Km	<i>Kanamicina</i>
L15	<i>Leibovitz -15 Medium</i>
MUT	Mutado
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampón fosfato salino)
PBTX	<i>phosphate buffer + Triton-X</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PFA	Paraformaldehído
PNS	<i>Peripheral nervous system</i> (Sistema nervioso periférico)
P/S	Penicilina/estreptomicina
RT	<i>Room temperature</i> , (temperatura ambiente)
SGZ	<i>Subgranular zone</i>

SVZ	<i>Subventricular zone</i>
TH	Tirosina hidroxilasa
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	<i>Wild type</i>

Introducción

Introducción

1. El cuerpo carotídeo

1.1. Fisiología del cuerpo carotídeo

El cuerpo carotídeo (CB, del inglés “*Carotid Body*”) es un órgano quimiorreceptor situado en la bifurcación de la arteria carótida (Figura 1A), encargado de detectar cambios en distintas variables químicas de la sangre, como la presión parcial de CO₂, el pH, la glucemia y principalmente la presión parcial de oxígeno (PO₂). El CB presenta fibras nerviosas aferentes que forman parte del nervio glosofaríngeo, y una gran red de vasos sanguíneos (Kameda, 2005; López-Barneo et al., 2001). Este quimiorreceptor es un componente clave del sistema de homeostasis del O₂ en sangre, y concretamente es necesario para activar la respuesta pulmonar de hiperventilación ante situaciones de hipoxemia, por ejemplo en personas que viven a una altitud elevada o en pacientes que sufren enfermedades crónicas con obstrucción pulmonar (Weir et al., 2005).

El CB está presente principalmente en mamíferos y aves, donde es crucial para la supervivencia pues facilita un rápido ajuste de las respuestas respiratoria y cardiovascular en situaciones de hipoxemia, lo que asegura el aporte de O₂ al cerebro y al corazón (López-Barneo et al., 2001). Otros vertebrados poseen estructuras similares al CB, como pueden ser el arco branquial y los quimiorreceptores de O₂ en peces, o el laberinto carotídeo en anfibios (Hempleman y Warburton, 2013).

El CB está innervado por fibras sensoriales aferentes del sistema nervioso autónomo, principalmente por el nervio del seno carotídeo. Además de la innervación sensorial, el CB recibe innervación eferente parasimpática y simpática, esta última a partir de pequeños nervios ganglioglomerulares procedentes del vecino ganglio cervical superior (Fidone y González, 1986). Además, el CB recibe sangre de una rama de la arteria carótida externa que se divide hasta pequeños capilares que quedan distribuidos por todo el parénquima neural del órgano, convirtiéndolo en uno de los tejidos más irrigados del organismo (Fidone y González, 1986). Tanto la vasculatura como el

parénquima neural del CB juegan un papel importante en la aclimatación del órgano a la hipoxemia, como se verá a continuación.

El parénquima neural del CB se organiza en glomérulos compuestos por células glómicas o tipo I, envueltas por células de sostén, llamadas sustentaculares o tipo II (Figura 1A). Las células glómicas son células más o menos esféricas de 10-12 μm de diámetro, que se caracterizan por tener numerosas vesículas secretoras cargadas de neurotransmisores (ATP, dopamina, acetilcolina), además de diversos péptidos neuromoduladores (sustancia P, encefalinas, endotelina-1) (Platero-Luengo et al., 2014a; Smith et al., 1990). Al ser altamente dopaminérgicas las células glómicas tienen una alta expresión del marcador tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Las células tipo I tienen función quimiorreceptora y comunican los cambios en las variables químicas sanguíneas liberando neurotransmisores junto a las terminaciones nerviosas aferentes que inervan el CB. Estos axones llevan la información hasta los centros cardiorrespiratorios del tronco del encéfalo, donde se ponen en marcha las respuestas compensatorias. Las células glómicas definen el parénquima neurosecretor del CB y comparten muchas propiedades con las neuronas, por lo que se les considera células neuronales especializadas (López-Barneo, 2003).

Las células sustentaculares son de menor tamaño y de forma más alargada que las células glómicas, y poseen extensos procesos citoplasmáticos que envuelven a las células neuronales (Figura 1A). Las células tipo II se caracterizan por la expresión de marcadores de tipo glial como las proteínas GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) y S100. Además de estos dos tipos celulares, en el CB se pueden encontrar células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y un pequeño número de neuronas parasimpáticas localizadas interglomerularmente, cuyos axones inervan a capilares y arteriolas (Fidone y González, 1986). Al poseer características propias de células gliales, clásicamente se pensó que las células tipo II tenían una función meramente de soporte de las tipo I. Sin embargo, datos experimentales obtenidos en nuestro grupo muestran que las células tipo II son células madre neurales en estado quiescente, y en respuesta a hipoxia pueden proliferar y diferenciarse hacia nuevas células glómicas (Figura 1B), facilitando la adaptación fisiológica del órgano a la hipoxia crónica, tal y como se expondrá más adelante (Pardal et al., 2007) (Figura 1C). Las células tipo II presentan un fenotipo glial y comparten características con las células madre de los nichos neurogénicos del

sistema nervioso central (CNS, del inglés *central nervous system*). Podemos por tanto considerar al CB adulto como un nicho neurogénico funcionalmente activo, localizado en el sistema nervioso periférico (PNS, del inglés *peripheral nervous system*).

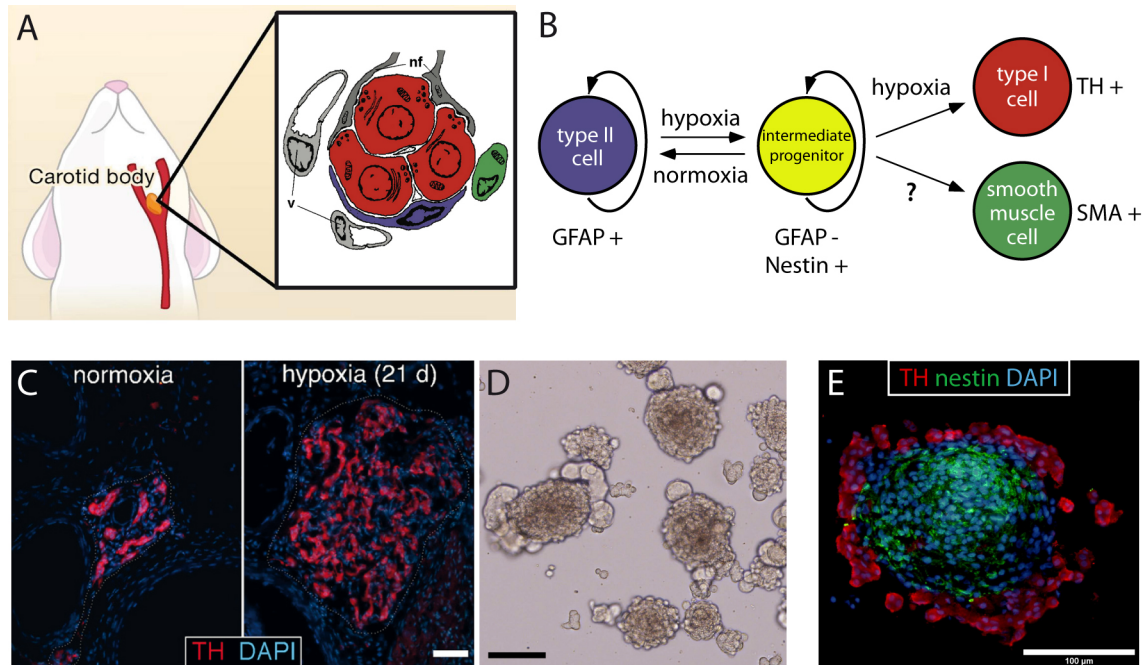


Figura 1. Organización y tipos celulares del cuerpo carotídeo. **A**, Localización del CB en rata adulta y estructura celular de un glomérulo. Modificado de *Kokovay et al. 2007* y de *Pardal et al. 2007*. **B**, Diagrama representativo de los tipos celulares y los procesos que tienen lugar en el CB en respuesta a hipoxia. Adaptado de *Pardal et al. 2010*. **C**, Inmunohistoquímica contra TH (rojo) en CB de ratón normóxico (control, izquierda) y expuesto a hipoxia crónica (10% O₂) durante 21 días (derecha). Modificado de *Pardal et al. 2007*. **D**, Imagen en campo claro de neuroesferas de CB. **E**, Inmunohistoquímica de secciones de una neuroesfera, marcada con Nestina (verde) y TH (rojo). Escalas, 50 µm en (C), 100 µm en (D y E).

La principal característica funcional del CB es su sensibilidad a los cambios en la tensión de O₂ del medio. La disminución de la tensión de O₂ sanguíneo (hipoxemia) es detectada por las células tipo I, que son excitables y contienen un amplio espectro de canales voltaje y ligando dependientes (Duchen et al., 1988; López-Barneo et al., 1988). Las células glómicas constituyen el elemento quimiorreceptor del CB que detecta la hipoxemia. La disminución en la PO₂ provoca el cierre de canales de K⁺ en estas células, con la consecuente reducción de la conductancia a este ión, desencadenándose así la despolarización celular (Buckler y Vaughan-Jones, 1998; López-Barneo et al., 1988; Peers y Green, 1991; Stea y Nurse, 1991). Como resultado de esta despolarización, se abren canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes, facilitándose la entrada de calcio y activándose la secreción de neurotransmisores por exocitosis (Ureña et al.,

1994). La liberación de neurotransmisores al espacio sináptico activa a las fibras sensoriales aferentes que conducirán la información a los centros respiratorios del bulbo raquídeo para que estos disparen la respuesta hiperventilatoria pulmonar y de esta forma se restauren los niveles de O₂ en el organismo (Montoro et al., 1996; Peers y Buckler, 1995; Ureña et al., 1994).

Las células glómicas también se despolarizan en respuesta a una reducción de la glucosa extracelular (Fitzgerald et al., 2009; García-Fernández et al., 2007; Pardal y López-Barneo, 2002; Zhang et al., 2007). Aunque el papel del CB como regulador de la glucemia en sangre ha estado clásicamente sujeto a debate (Bin-Jaliah et al., 2004; Gallego-Martin et al., 2004), estudios recientes con tejido humano han confirmado la capacidad de las células glómicas para detectar los niveles de glucosa (Ortega-Sáenz et al., 2013; Wehrwein et al., 2015).

Además de la respuesta del CB a la hipoxia aguda, cuando la condición de hipoxemia es mantenida en el tiempo, se desencadenan dentro del órgano numerosos cambios moleculares, neuroquímicos y anatómicos (Bisgard, 2000; Wang y Bisgard, 2005), siendo el más significativo un aumento considerable del tamaño del parénquima neurosecretor, del número de células neuronales (Figura 1C). Este cambio morfológico, que incrementa los impulsos excitatorios que recibe el centro respiratorio, constituye una respuesta homeostática fundamental que permite la aclimatación de los humanos y otros mamíferos a la altitud, y ayuda a la supervivencia de los pacientes con enfermedades cardiorrespiratorias asociadas a hipoxemia (Edwards et al., 1970; López-Barneo et al., 2001; Weir et al., 2005). La hipertrofia del CB en condiciones de hipoxia incluye igualmente un aumento de la vascularización (Arias-Stella y Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984). Estos dos procesos de neurogénesis y angiogénesis son en parte el resultado de la actividad de las células madre del cuerpo carotídeo (CBSCs, del inglés *carotid body stem cells*), cuyo estudio es el objetivo principal de nuestro grupo.

2. Células madre; aspectos generales

Durante la Segunda Guerra Mundial, los estudios sobre el daño producido por emisiones nucleares condujeron al descubrimiento de unas células capaces de regenerar

tejidos dañados por la radiación (Becker et al., 1963; Till y McCulloch, 1961). Al principio se las denominó *unidades formadoras de colonias*, debido a su capacidad de auto-renovación y formación de colonias *in vitro* (Till y McCulloch, 1961). La médula ósea fue la primera fuente descrita de las finalmente denominadas células madre (Scadden, 2014), y las células madre hematopoyéticas (HSCs, del inglés *hematopoietic stem cells*) que residen en ella son indudablemente las mejor caracterizadas hoy en día (Blau et al., 2001). Tras el desarrollo de co-cultivos con células estromales para mantener a las HSCs *in vitro*, se demostró que estas células dependían de otras células para sobrevivir (Dexter et al., 1977), lo que constituyó la primera evidencia de la existencia de un nicho celular para las células madre. Posteriormente se descubrieron células pluripotentes en la masa celular interna del blastocisto embrionario, a las que se denominó células madre embrionarias (ESCs, del inglés *embryonic stem cells*) (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), y que proliferan *in vitro* de manera indiferenciada e ilimitadamente (Bongso et al., 1994; Ramalho-Santos et al., 2002). Las ESCs dan lugar a las tres capas germinales y podrían utilizarse en el tratamiento de un sinfín de afecciones como la enfermedad de Parkinson, las lesiones en la médula espinal o la diabetes (Thomson et al., 1998). Sin embargo, el uso de embriones humanos presenta diversos conflictos éticos. Por ello, las células madre específicas de tejido, grupo al que pertenecen las HSCs, son consideradas como potencialmente muy útiles para la regeneración de tejido dañado. Aunque estas células madre somáticas no tienen la pluripotencialidad de las ESCs, poseen cierta plasticidad de diferenciación, determinada por el linaje celular del que derivan. Además, su utilización no conlleva problemas de carácter ético.

En base a su origen y a su potencial de diferenciación hoy en día las células madre se clasifican en dos grandes grupos: pluripotentes y multipotentes. Las células madre pluripotentes son las ESCs y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*) (Takahashi y Yamanaka, 2006). Las células madre somáticas o específicas de tejido son las denominadas multipotentes, y existen multitud de variedades, encontrándose prácticamente en todos los tejidos, por ejemplo, las células madre neurales (NSCs, del inglés *neural stem cells*) (Yoo et al., 2013), que residen en el sistema nervioso. Se han trazado muchos paralelismos entre las NSCs y las HSCs (Morrison et al., 1995) en cuanto a su biología y comportamiento, pero siguen existiendo problemas metodológicos para llevar a cabo estos estudios comparativos,

principalmente debido a que las HSCs pueden aislarse mediante citometría de flujo o FACS, mientras que apenas contamos con buenos marcadores para aislar por citometría las NSCs. De hecho, este problema de aislamiento prospectivo de las distintas poblaciones de células madre somáticas es el que ha provocado que el progreso en el conocimiento de las propiedades de las células madre específicas de tejido haya tenido lugar preferentemente en el sistema hematopoyético (Morrison et al., 1999).

Por definición, una célula madre es aquella célula indiferenciada con capacidad de proliferación, auto-renovación y producción de un número diverso de tipos de células diferenciadas, es decir, aquella célula responsable de la regeneración y mantenimiento del tejido en el que reside. Aunque algunos autores defendieron que las células madre somáticas podían sufrir “transdiferenciación”, y contribuir así a la regeneración de tejidos diferentes a su tejido de origen (Blau et al., 2001), hoy en día esa teoría está muy cuestionada (Álvarez-Dolado et al., 2003). En general se acepta que las células madre somáticas son multipotentes, poseen plasticidad de diferenciación, pero siempre generan tipos celulares propios del tejido en el que residen. Esta plasticidad que poseen las células madre somáticas presenta un interés especial por su potencial uso en terapia celular frente a numerosas enfermedades metabólicas, inmunológicas y degenerativas (Stewart, 2004), como es el caso del uso de las NSCs frente a la enfermedad de Parkinson o de Huntington (Yoo et al., 2013).

3. Células madre neurales somáticas; concepto y metodología de estudio

La visión clásica del sistema nervioso cambió en la década de los 60 debido a la caracterización de la neurogénesis, o producción de nuevas neuronas, en el sistema nervioso adulto. Hasta ese momento, el dogma existente consideraba el CNS como una estructura inmutable y terminalmente diferenciada. Santiago Ramón y Cajal (1913) concluyó en sus estudios que las neuronas se generaban exclusivamente durante el desarrollo prenatal, y aunque muchos datos sugerían la existencia de células en división en el CNS (Allen, 1912; Hamilton, 1901), fue imposible, con las herramientas de la época, realizar el seguimiento de dichas células y demostrar que se trataba de nuevas

neuronas en lugar de glía (Ramón y Cajal, 1913). La creencia de que no se producían nuevas neuronas tras el nacimiento perduró prácticamente un siglo (Gross, 2000).

En la segunda mitad del siglo XX se publicaron una serie de artículos mostrando evidencias de la aparición de nuevas neuronas en varias regiones del cerebro de la rata adulta, incluyendo el giro dentado del hipocampo (Altman y Das, 1965), el neocórtex (Altman, 1966), y el bulbo olfatorio (AltmanJ, 1969). Sin embargo, a estos estudios se les dio poca importancia. No fue hasta mediados de los años 70 cuando se reconsideró la existencia de neurogénesis adulta (Kaplan y Hinds, 1977), ya que por primera vez se demostró que las neuronas nuevas del hipocampo sobrevivían durante largo tiempo. Los siguientes descubrimientos continuaron revelando la presencia en el cerebro adulto de neuronas jóvenes resultado de la diferenciación a partir de progenitores proliferativos, mayoritariamente en el hipocampo (Cameron et al., 1993). Al mismo tiempo se aislaron células progenitoras del CNS adulto, capaces de diferenciarse hacia neuronas y glía en cultivo (Reynolds y Weiss, 1992). Estas células se denominaron “células madre neurales” (NSCs), y se demostró que eran las responsables de la generación de nuevas neuronas en el sistema nervioso adulto, es decir, de la neurogénesis (Kuhn et al., 1996; Palmer et al., 1997). Las NSCs muestran características definitorias de célula madre: auto-renovación o capacidad de proliferar manteniendo la naturaleza de célula madre, y multipotencia o capacidad de diferenciación hacia distintos tipos celulares. En los años 90 los estudios sobre neurogénesis adulta se impulsaron debido al avance de nuevas tecnologías, y numerosos trabajos han demostrado desde entonces que en ciertas partes del cerebro adulto de mamíferos, incluido el humano, se generan nuevas neuronas a partir de unas células madre específicas de tejido neural.

Las NSCs del sistema nervioso central pueden generar los tres tipos celulares principales del cerebro: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (AltmanJ, 1969; Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; DoetschF. et al., 1999a; Lois et al., 1993; Palmer et al., 1997; Reynolds y Weiss, 1992; Weiss et al., 1996). La neurogénesis adulta en mamíferos se ha demostrado inequívocamente en dos zonas del cerebro: la zona subventricular (SVZ, del inglés *subventricular zone*), junto a los ventrículos laterales (DoetschF. et al., 1999a) (Figura 2), y la zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) en el giro dentado del hipocampo (Eriksson et al., 1998) (Figura 3). También se han propuesto otras zonas como posibles centros neurogénicos que están menos consensuadas y caracterizadas, como el bulbo olfatorio de roedores (Gritti et al.,

2002; Kornack y Rakic, 2001), o la zona subcallosa (Seri et al., 2006). Además del CNS, se ha demostrado la existencia de neurogénesis adulta en algunos órganos del PNS, como es el cuerpo carotídeo (Pardal et al., 2007).

3.1. Nichos neurogénicos en el sistema nervioso central

Estudios pioneros en la médula ósea ofrecieron los primeros datos sobre la interacción entre células madre y las células de su entorno más inmediato (Lord et al., 1975). Se describieron de esta forma microambientes necesarios para el mantenimiento de las células madre, a los que se denominó “nichos celulares” (Schofield, 1978). Además de la médula ósea, años más tarde se describieron este tipo de nichos de células madre en otros tejidos como por ejemplo el sistema nervioso central, donde las NSCs residen en dos microambientes hoy en día bien caracterizados: la zona subventricular y la zona subgranular del hipocampo.

3.1.1. La zona subventricular

La SVZ constituye la mayor región neurogénica del cerebro adulto. Las NSCs y sus derivados han sido bien caracterizados en esta región del cerebro de ratón adulto. Se conoce también la composición y organización, incluso a nivel ultraestructural, de las células dentro de esta región cerebral (Doetsch et al., 1997). Gracias a estos trabajos podemos distinguir cuatro tipos celulares principales: células astrocíticas o células tipo B, progenitores intermedios o células tipo C, neuroblastos o células tipo A, y células endodimales o tipo E (Figura 2). Las células neuronales neoformadas en la SVZ forman parte de una red de neuroblastos (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996) que migran tangencialmente por la vía migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio, donde se diferencian hacia dos tipos de neuronas inhibitorias: granulares y periglomerulares (Doetsch y Scharff, 2001). Los neuroblastos migran formando cadenas homotípicas (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Wichterle et al., 1997) a través de túneles generados por astrocitos maduros. A lo largo de esta red de cadenas celulares se encuentran agrupados (en *clusters*) los progenitores intermedios, que se dividen más rápido que las células tipo B. La SVZ está separada del ventrículo lateral por una capa de células endodimales multiciliadas o células tipo E. Aunque hay estudios que sugieren que las células endodimales son las células madre de este nicho y pueden dividirse *in vivo*

(Johansson et al., 1999), resultados posteriores lo contradijeron, estableciendo de forma definitiva que las células madre de la SVZ corresponden a las células astrocíticas tipo B (DoetschF. et al., 1999a). Las células endodimales se caracterizan por ser muy quiescentes, y rara vez forman neuroesferas en cultivo (Capela y Temple, 2002; Carlén et al., 2009; Coskun et al., 2008). Aunque poseen muchas diferencias morfológicas y fisiológicas *in vivo*, discriminar entre células astrocíticas tipo B y células endodimales en los estudios *in vitro* continua siendo muy complicado (Chojnacki et al., 2009), ya que existen muy pocos marcadores, y a veces no son exclusivos de un tipo celular (Beckervordersandforth et al., 2010). Este problema de detección específica y aislamiento prospectivo de células madre neurales se extiende a otros nichos neurogénicos, como son la SGZ o el cuerpo carotídeo.

Las células astrocíticas tipo B son los precursores primarios en la SVZ *in vivo*, y actúan como células madre también *in vitro* (DoetschF. et al., 1999b); proliferan y se diferencian hacia neuronas. No obstante, además de neurogénesis se han observado procesos de gliogénesis en esta región del cerebro (Levison y Goldman, 1993; Marshall y Goldman, 2002). Los progenitores de la SVZ pueden dar lugar *in vitro* a oligodendrocitos, y estudios *in vivo* muestran que contribuyen a la remielinización en lesiones desmielinizantes (Nait-Oumesmar et al., 2008), así como en situaciones normales (Doetsch, 2003). Estas células han demostrado por tanto su capacidad multipotente, tanto *in vivo* como *in vitro*.

En condiciones normales y durante procesos de regeneración, las células astrocíticas tipo B de la SVZ contactan con el ventrículo. Estas células B son morfológicamente muy diferentes a las células endodimales, ya que poseen un único cilio corto hacia el ventrículo (DoetschF. et al., 1999b), al igual que ocurre en los precursores neuronales del neuroepitelio embrionario (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958). Las células tipo B necesitan contactar con el ventrículo para llevar a cabo la neurogénesis, al igual que les ocurre a las células neuroepiteliales durante el desarrollo (DoetschF. et al., 1999b). Además, estas células están también en contacto con células endoteliales y son reguladas por factores liberados por los vasos sanguíneos, constituyendo lo que se ha denominado un nicho neurovascular (Suh et al., 2009).

Los estudios sobre los nichos neurogénicos del CNS han revelado que la microvasculatura local es clave para garantizar un ambiente adecuado para la expansión

de las NSCs, la diferenciación neuronal y la migración celular (Goldman y Chen, 2011). Se denomina microambiente vascular o perivascular al conjunto formado por las células endoteliales, las células perivasculares de soporte (incluyendo pericitos y células de músculo liso), los fibroblastos, la microglía, los progenitores gliales y las terminaciones astrocíticas que forman parte de la barrera hematoencefálica. La interacción combinada de todos estos tipos celulares y de los factores presentes (endoteliales o no endoteliales) influirá en las células madre, actuando sobre la proliferación, la diferenciación o la incorporación de células diferenciadas al parénquima cerebral (Bovetti et al., 2007; Leventhal et al., 1999; Louissaint et al., 2002; Ohab et al., 2006; Snapyan et al., 2009).

En la SVZ, las células astrocíticas tipo B y los progenitores intermedios derivados (células tipo C), se encuentran cerca de la vasculatura, tanto en condiciones de homeostasis como de daño tisular y regeneración del tejido. Una característica propia del nicho vascular de la SVZ es la manera en la que las células tipo B, que están en contacto directo con los capilares, se unen a ellos, ya que establecen la unión sólo en zonas del vaso que están desprovistas de otras células astrocíticas y de pericitos (Tavazoie et al., 2008). La unión entre las NSCs y la microvasculatura no se produce por motivos exclusivamente de supervivencia de las primeras, sino también por motivos de cohesión y funcionamiento del nicho, ya que el contacto directo con la superficie de los vasos ayuda a mantener las propiedades de célula madre y a regular el estado proliferativo de las células tipo B y de las células tipo C (Shen et al., 2008). Por otro lado, los neuroblastos, aunque se sitúan a cierta distancia de los vasos sanguíneos, pueden ver modificada su migración por los factores que llegan por el torrente sanguíneo (Tavazoie et al., 2008) o por las moléculas secretadas por células vasculares asociadas a los vasos (Shen et al., 2008). Todos los tipos celulares de la zona subventricular, excepto las células endodiales, están más o menos próximos a la vasculatura.

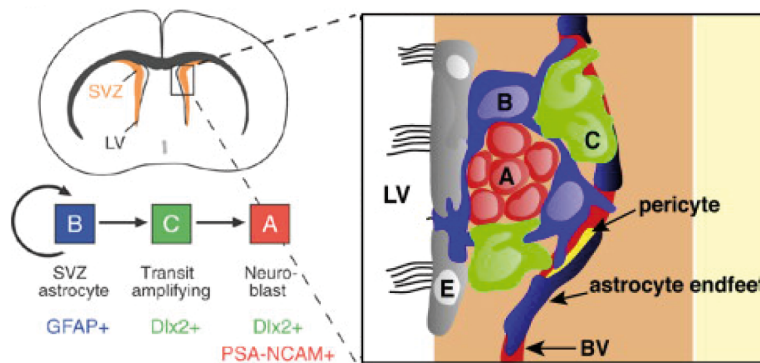


Figura 2. Organización y tipos celulares de la SVZ. Esquema frontal de cerebro de ratón adulto mostrando la SVZ (naranja), adyacente al ventrículo lateral (LV), y esquema de las células de la SVZ; células endociliales multi-ciliadas (E, gris), neuroblastos (A, rojo), astrocitos (B, azul) formando un túnel por el que migran los neuroblastos, y progenitores (C, verde). Adaptado de *Doetsch, 2003* y *Tavazoie et al, 2008*.

3.1.2. La zona subgranular

El hipocampo constituye otro nicho neurogénico del CNS (Eriksson et al., 1998). La zona subgranular (SGZ) es una capa germinal situada entre la capa de células neuronales granulares y el hilio, dentro del giro dentado del hipocampo. Las neuronas granulares neoformadas en el giro dentado sólo migran una corta distancia hacia la capa de células granulares (Doetsch, 2003). Desde esta capa, las nuevas neuronas proyectan hacia la región CA3 del hipocampo, conectando con interneuronas y células piramidales, e integrándose en los circuitos neuronales.

En la SGZ hay dos tipos celulares principales: astrocitos o células tipo B, positivos para la proteína glial GFAP, y células tipo D, negativas para GFAP (Seri et al., 2001) (Figura 3). Al igual que en la SVZ, las células astrocitarias GFAP⁺ de la SGZ actúan como los precursores primarios del nicho y se diferencian originando las células tipo D, que cumplen la función de los precursores intermedios de la SVZ. Las células D serán las que completen su diferenciación hacia neuronas granulares (Seri et al., 2001). A diferencia de las células C de la SVZ, las D de la SGZ se dividen menos frecuentemente y están más diferenciadas, habiendo incluso comenzado a expresar marcadores de diferenciación neuronal (Palmer et al., 1997; Seri et al., 2001).

Las células madre de la SGZ se encuentran también íntimamente asociadas al sistema vascular. Las neuronas neoformadas en la zona subgranular se generan en *clusters* o agrupaciones, en la proximidad de los vasos sanguíneos, en los llamados focos angiogénicos del hipocampo (Palmer et al., 2000). Tres semanas después de la

neurogénesis, muchas células endoteliales desaparecen, sugiriendo que la neurogénesis está íntimamente asociada con un proceso de movilización y posterior remodelación vascular. La neurogénesis se desarrolla por tanto en un nicho vascular especializado, en el que células mesenquimales, células vasculares, y factores circulantes modifican la plasticidad de las NSCs de esta región del CNS adulto (Palmer et al., 2000). A diferencia de la SVZ, la vasculatura de la SGZ contiene una población de células endoteliales que se divide activamente, y la neurogénesis que tiene lugar en este nicho sí está asociada a la angiogénesis que ocurre en el mismo (Palmer et al., 2000). De hecho, el hipocampo fue la primera zona en la que se observó una asociación entre angiogénesis y neurogénesis (Palmer et al., 2000), sugiriendo que las células endoteliales y los progenitores neurales responden a señales mitogénicas comunes, o que uno de los tipos celulares (célula endotelial o progenitor neural) genera mitógenos capaces de conducir la respuesta mitótica de los otros de manera sincronizada (Goldman y Chen, 2011). En el CB también existe una asociación entre neurogénesis y angiogénesis durante la activación del nicho en hipoxia crónica, como se expone más adelante, y datos obtenidos recientemente por nuestro grupo muestran que factores vasculares, como la eritropoyetina (EPO), inducen la diferenciación de los progenitores del nicho hacia células endoteliales, contribuyendo así a la angiogénesis que tiene lugar en el órgano (Annese et al., en revisión).

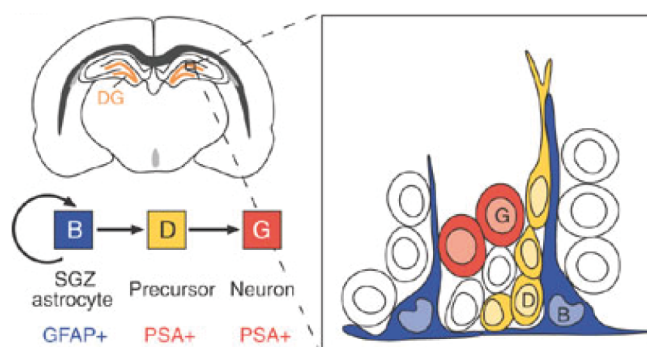


Figura 3. Organización y tipos celulares de la SGZ. Esquema frontal de cerebro de ratón adulto en el que se muestra el giro dentado (naranja) y los tipos celulares en la SGZ; astrocitos (B, azul), precursores intermedios (D, amarillo), y neuronas granulares (G, rojo). Tomado de *Doetsch, F. 2003*.

3.2. Células madre de la cresta neural

La cresta neural es una estructura embrionaria característica de los vertebrados, que deriva del ectodermo, da lugar al PNS, y se localiza en los márgenes del primordio neural, formando un área intermedia entre el epitelio neural y la epidermis. A principios de los 90 se aislaron progenitores multipotentes de la cresta neural de mamíferos (Stemple y Anderson, 1992). Posteriormente se comprobó que estas células tenían capacidad de proliferar y generar neuronas, glía, y músculo liso, revelando este último tipo celular la naturaleza mesectodérmica de estas células (Shah et al., 1996). A estos progenitores se les denominó células madre neurales derivadas de la cresta neural (NCSCs, del inglés *neural crest stem cells*). Estas NCSCs son capaces de diferenciarse hacia neuronas, glía y miofibroblastos *in vitro*, y tienen potencial de auto-renovación, demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (Morrison et al., 1999). Posteriormente se descubrieron zonas del PNS donde persistían NCSCs adultas, como el sistema nervioso entérico (Bixby et al., 2002; Kruger et al., 2002), el ganglio de la raíz dorsal (Hagedorn et al., 1999; Nagoshi et al., 2008) o la región cardíaca (Tomita et al., 2005). Gracias a datos previos de nuestro grupo, hoy en día conocemos la existencia de NCSCs en el cuerpo carotídeo adulto (identificadas como las células tipo II o sustentaculares), que como se ha introducido anteriormente se trata de un importante quimiorreceptor del PNS de los mamíferos (Pardal et al., 2007). Diversos órganos del PNS poseen tipos celulares con características similares a las células tipo II del CB, con perfil glial y forma sustentacular o de sostén dentro del nicho. Se han descrito células satélite que expresan GFAP y Vimentina en otras estructuras simpatoadrenales, como la médula adrenal o el ganglio simpático (Kameda, 1996; Shi et al., 2008). Además, algunas de estas poblaciones de células gliales satélite, como las del ganglio de la raíz dorsal, parecen comportarse como progenitores en cultivo, y se activan *in situ* en respuesta a un daño en el tejido (Li et al., 2007). No obstante, queda pendiente aclarar si estas células de tipo glial son verdaderamente células madre adultas del PNS, con capacidad de llevar a cabo neurogénesis en condiciones fisiológicas o patológicas (Pardal et al., 2010). El CB supone un interesante nicho germinal para estudiar las NCSCs adultas, ya que contamos con metodología específica y precisa para activar al órgano, como es la exposición del animal a un ambiente hipóxico. Esta sencilla estrategia experimental nos permitirá profundizar en el conocimiento de la biología de las NCSCs del órgano, así como en la caracterización de poblaciones celulares asociadas al linaje germinal.

3.3. El cuerpo carotídeo, nicho germinal del sistema nervioso periférico adulto

Actualmente no se conoce con detalle la función que desempeñan las NCSCs en el PNS adulto (Dupin y Le Douarin, 2014). El único caso en el que se ha descrito un papel claro de estas células en la fisiología del órgano en el que residen lo constituye el CB (Pardal et al., 2007). El estudio de este nicho neurogénico adulto es uno de los objetivos principales de la investigación que se lleva a cabo en el laboratorio del Dr. Pardal, en el cual se ha realizado la presente tesis doctoral.

En hipoxia las células madre del cuerpo carotídeo (CBSCs, del inglés *carotid body stem cells*) proliferan y llevan a cabo neurogénesis para dar lugar a nuevas células glómicas, lo que contribuye a la adaptación del órgano a un estímulo hipóxico mantenido (Pardal et al., 2007). En condiciones de normoxia, la población de células madre del CB permanece quiescente, pero en hipoxia las CBSCs GFAP⁺ se transforman en progenitores proliferativos Nestina⁺, los cuales eventualmente darán lugar a nuevas células glómicas TH⁺ (López-Barneo et al., 2008). La hipertrofia e hiperplasia de las células glómicas (McGregor et al., 1984), junto con la generación de nuevas células tipo I, tiene como resultado el incremento en el parénquima neurosecretor dopaminérgico. Aunque algunas células TH⁺ tienen la capacidad de sufrir mitosis (Chen et al., 2007a; Pardal et al., 2007; Wang et al., 2008), los resultados previos de nuestro grupo han confirmado que gran parte de las nuevas células glómicas aparecidas en hipoxia se originan a partir de los progenitores del CB (Pardal et al., 2007).

La hipertrofia del CB en condiciones de hipoxia crónica incluye igualmente un aumento de la vascularización (Arias-Stella y Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984), debido a vasodilatación y a la aparición de nuevos vasos, probablemente provocado por la sobre-expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) (Chen et al., 2003). El CB está irrigado por una profusa red de vasos sanguíneos y capilares que se entrelaza entre los glomérulos de células neurales. Esta vasculatura sufre angiogénesis durante la exposición a hipoxia crónica, siguiendo una dinámica de crecimiento paralela al aumento de parénquima neural experimentado por el órgano. La red de vasos sanguíneos parece por tanto estar fuertemente coordinada con las células neurales, pues además, al decrecer el tejido neural cuando se restablecen los valores normóxicos de oxígeno, ocurre igualmente una reducción paralela del número de vasos sanguíneos (Platero-Luengo, 2014b). El CB es

uno de los órganos más irrigados del organismo y muestra una situación estructural a nivel celular óptima para el establecimiento de un nicho vascular para las NCSCs. Además, tras la activación del órgano en hipoxia crónica, el intenso proceso angiogénico que se pone en marcha podría potenciar aún más las interacciones entre células vasculares y neurales. De forma muy relevante para esta tesis doctoral, resultados recientes de nuestro grupo han demostrado que parte de esta angiogénesis es fruto de la actividad de las propias células madre neurales del órgano, las células tipo II (Annese et al., en revisión). Estas NCSCs adultas mantienen por tanto la típica plasticidad de la cresta neural, siendo capaces de diferenciarse hacia células neuronales y endoteliales en respuesta al estímulo hipóxico, contribuyendo de esta forma tanto a la neurogénesis como a la angiogénesis. El sistema neurovascular de este nicho juega por tanto un papel clave en la fisiología del órgano.

Las células endoteliales también son sensibles a la hipoxia, y responden mediante liberación de factores solubles, como endotelina-1 (ET-1) o VEGF, provocando la diferenciación de las células madre y un incremento aún mayor de la angiogénesis (Goldman y Chen, 2011; Palmer et al., 2000). El CB ofrece una oportunidad excelente para estudiar la importancia de moléculas liberadas por el nicho vascular en la regulación del comportamiento de las NCSCs. Un gran número de estos factores vasculares controlan la proliferación de progenitores neurales en otras regiones del sistema nervioso (Ramírez-Castillejo et al., 2006; Shen et al., 2008).

El CB transduce la disminución de la PO_2 al CNS a través de la secreción de vesículas por parte de las células glómicas (López-Barneo et al., 1988). Estas vesículas contienen gran variedad de neurotransmisores, a la vez que neuromoduladores del tipo de encefalinas, sustancia P (SP), péptido natriurético atrial, neurokinina A, neuropéptido Y, o endotelinas (Kumar, 1997; Platero-Luengo et al., 2014a). La participación activa de algunas de estas moléculas (SP, ET-1) en la regulación de la actividad quimiorreceptora está ampliamente descrita (Fidone y González, 1986; López-Barneo et al., 2008; Smith et al., 1990). Nuestro grupo incluso ha demostrado que algunos de estos neuromoduladores, como la ET-1, juegan un papel en la activación proliferativa de las células madre, gracias a una estructura especial de interacción entre las células neuronales y las células madre a la que se ha denominado sinapsis quimioproliferativa (Platero-Luengo et al., 2014a). La existencia de este tipo de interacción permite acoplar la actividad germinal del órgano con la actividad quimiorreceptora neuronal. La función

de muchas otras de las moléculas incluidas en las vesículas neuronales del CB, como la bradiquinina (BK), sobre la biología de las células progenitoras, está aún por estudiar. En este trabajo se aborda, al menos parcialmente, el estudio de algunas de estas moléculas.

4. Células madre del cuerpo carotídeo (CBSCs)

4.1. Mecanismos de proliferación y diferenciación de las CBSCs

El estímulo proliferativo del CB es la hipoxemia crónica. Pasados 2-3 días de exposición al estímulo hipóxico, se observa una proliferación de las células tipo II seguida de su diferenciación hacia células glómicas (Pardal et al., 2007) (véase la figura 1B). Como acabamos de exponer, también se ha demostrado en nuestro grupo que las células tipo II tienen la capacidad de diferenciarse tanto *in vivo* como *in vitro* hacia células de músculo liso SMA⁺ (Pardal et al., 2007), y células endoteliales (Annese et al., en revisión). Esta capacidad multipotente de diferenciación hacia ambos linajes neuronal y mesectodérmico podría indicar que las CBSCs llevan a cabo divisiones asimétricas, además de las típicas divisiones simétricas necesarias para la auto-renovación. Aunque este es un aspecto que se ha estudiado en otros tipos de células madre del sistema nervioso (Gage, 2000; Luque y Gimenez y Ribotta, 2004; Shah et al., 1996), no ha sido abordado de forma específica en el presente trabajo de tesis doctoral.

Los datos previos de nuestro grupo han permitido dilucidar por tanto mecanismos a nivel celular y molecular que explican la activación proliferativa de las CBSCs y su diferenciación hacia el linaje neuronal (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014a). Sin embargo, la diferenciación de estos progenitores específicos de tejido hacia el linaje mesectodérmico está mucho menos estudiada. Igualmente, se conoce muy poco acerca de los mecanismos de regulación de la angiogénesis que tiene lugar en el órgano durante la exposición a hipoxia crónica. En este trabajo de tesis doctoral hemos investigado más a fondo sobre esta cuestión.

4.2. Progenitores neurales restringidos del cuerpo carotídeo

A diferencia de las células madre neurales multipotentes, un progenitor neural restringido se define como aquella célula que generalmente madura hacia un único tipo celular determinado (progenitor unipotente) (Luque y Gimenez y Ribotta, 2004). Las CBSCs se dividen dando lugar a los progenitores Nestina⁺, en este caso aún multipotentes, que de hecho pueden revertir hacia células madre quiescentes de nuevo (Pardal et al., 2007) (véase el diagrama celular del CB de la figura 1B). Tras diversos estudios, hoy en día sabemos que los nichos neurogénicos contienen progenitores restringidos hacia linajes celulares específicos propios del tejido. En la SVZ por ejemplo existe una subpoblación de progenitores indiferenciados pero restringidos hacia el linaje de oligodendrocitos (Nait-Oumesmar et al., 2008).

El linaje germinal del CB descrito hasta ahora contempla que, en condiciones de hipoxia, la célula madre GFAP⁺ da lugar de manera reversible a un progenitor intermedio (Nestina⁺) (Pardal et al., 2007), y éste prolifera y se diferencia hacia células neuronales TH⁺ o hacia células de músculo liso SMA⁺ (Pardal et al., 2010). Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral proponen que en el CB, de forma parecida a lo explicado para otros nichos neurogénicos, podrían existir subpoblaciones de progenitores neurales indiferenciados pero restringidos hacia un linaje específico del CB. La hipoxia podría de nuevo estar jugando un papel clave en la activación y diferenciación de estas subpoblaciones de progenitores restringidos de este tejido. El presente trabajo de tesis doctoral pretende esclarecer la existencia de estos progenitores restringidos en el CB, especialmente aquellos especificados hacia linaje mesectodérmico.

4.3. Origen embrionario de las células madre de cuerpo carotídeo

Para entender la capacidad multipotente de las CBSCs y su especificidad de diferenciación, resulta adecuado conocer en detalle el origen embrionario de este tejido glómico. La cresta neural está compuesta por una población de células embrionarias multipotentes que se delaminan antes del cierre del tubo neural durante la neurulación (Dupin y Sommer, 2012; LeDouarin, 1986a) (Figura 4). Entre estas células se encuentran las células madre de la cresta neural (NCSCs) (Kruger et al., 2002). Durante su migración, las células de la cresta neural sufren una limitación o restricción

progresiva de su plasticidad (Baroffio et al., 1991). Finalmente, y en función de su posición de origen a lo largo del tubo neural, colonizan varios tejidos donde se diferencian a diversos tipos celulares. Las células de la cresta neural dan lugar a gran diversidad de estructuras, que incluyen el esqueleto craneofacial, la mandíbula, los melanocitos de la piel, células musculares lisas de las arterias del arco branquial y otras células vasculares, y la mayoría del PNS, incluyendo los ganglios autonómicos, como el ganglio cervical superior, ganglios entéricos, ganglios de la raíz dorsal, células de Schwann, células cromafines de la médula adrenal, y algunos órganos sensoriales especializados como el cuerpo carotídeo (Dupin y Sommer, 2012; Jiang et al., 2000; LeDouarin, 1986a). La enorme diversidad de tejidos que genera la cresta neural ha motivado un debate sobre la posible multipotencia de las células de la cresta neural. Hoy en día se plantean dos modelos posibles; uno propone que la población de células de la cresta neural es multipotente y capaz de dar lugar a todos los tipos celulares o la mayoría de ellos (Baggiolini et al., 2015). Y por el contrario el otro modelo sostiene que existe una mezcla de células madre que están predeterminadas hacia un único tipo de tejido.

Los primeros estudios de la cresta neural se llevaron a cabo en aves, pues tienen un desarrollo embrionario similar al de humanos y sus células son accesibles durante toda la gestación. Los embriones de pollo (*Gallus gallus*) o de codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) son los modelos más utilizados. Para poder marcar y monitorizar las células de la cresta neural se crearon quimeras *in ovo* entre ambas especies (Le Douarin, 1980; LeDouarin, 1986a). Estas quimeras fueron el primer sistema estable para el seguimiento de las células de la cresta neural, y con ellas se demostró que el CB de las aves efectivamente se origina a partir de la cresta neural (Le Douarin, 1980; Le Lièvre y Le Douarin, 1975; LeDouarin, 1986a; Pearse et al., 1973). Durante años se asumió el mismo origen para las células glómicas del CB de otros vertebrados (Hempleman y Warburton, 2013), hasta que pudo corroborarse mediante un sistema de seguimiento del linaje celular específico de mamíferos: un ratón transgénico con el promotor *Wnt1* (un proto-oncogén expresado por células de la cresta neural) unido a un gen reportero (Chai et al., 2000; Jiang et al., 2000). Esta técnica de trazado de linaje celular ha permitido confirmar que tanto las células glómicas como las tipo II tienen su origen en la cresta neural (Pardal et al., 2007).

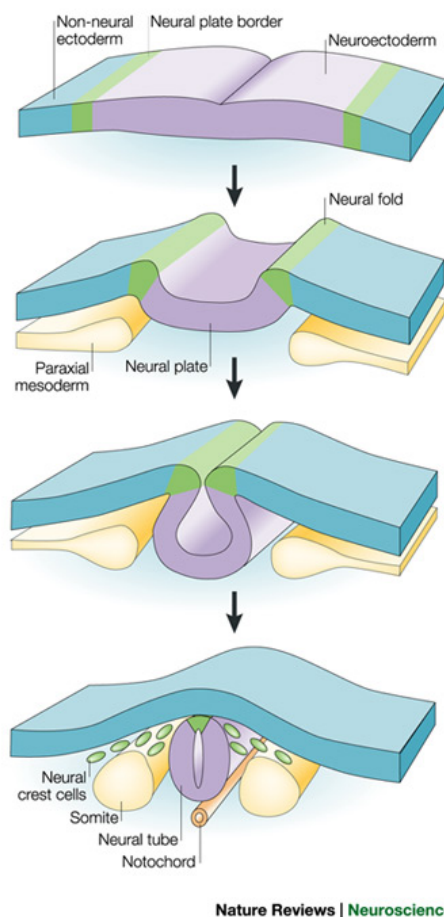


Figura 4. Formación de la cresta neural. La cresta neural (verde) aparece en el borde de la placa neural. Tras el cierre del tubo neural, las células de la cresta neural se delaminan desde la región entre el tubo neural dorsal y el ectodermo suprayacente, y migran hacia la periferia. Adaptado de *Gammill y Bronner-Fraser, 2003*.

La cresta neural se estructura en cuatro regiones: craneal, troncal, vagal y sacral. Las NCSCs se especifican hacia distintos linajes dependiendo de su posición inicial en la cresta neural, siendo la región cefálica (craneal y vagal) a la cual pertenece el CB, más plástica que las partes troncal y sacral (LaBonne y Bronner-Fraser, 1998). El CB se forma durante el desarrollo fetal mediante la migración de progenitores simpatoadrenales especificados en las proximidades de la aorta (Saito et al., 2012). En mamíferos, el primer signo morfológico del CB es una acumulación de células mesenquimales en la pared de la tercera arteria branquial (Kondo, 1975), constituyendo lo que se conoce como el primordio del CB (Hempleman y Warburton, 2013; Kameda, 2005). Las paredes de las arterias de los arcos branquiales o faríngeos, incluida la tercera arteria branquial, derivan de células mesenquimales o mesectodérmicas de la cresta neural (Jiang et al., 2000). El primordio es colonizado por células precursoras neurales, procedentes del vecino ganglio cervical superior, que irán migrando y diferenciándose hasta convertirse en células glómicas (Kameda, 2002; Kameda et al.,

2002; Kameda et al., 1994; Le Douarin et al., 1972). Asimismo, el primordio es innervado durante todo el proceso por fibras procedentes del ganglio cervical superior y del nervio glosofaríngeo. Varios estudios con ratones transgénicos proponen que el CB está formado por células procedentes de dos linajes de la cresta neural (Kameda, 2005; Kameda et al., 2012; Pardal et al., 2007): células mesenquimales procedentes de la tercera arteria branquial (Jiang et al., 2000; Kameda, 2005; Le Lièvre y Le Douarin, 1975; Waldo et al., 1999), y células neurales derivadas del ganglio vecino, el ganglio cervical superior (Kameda, 2005; Le Douarin et al., 1972; LeDouarin, 1986b). Este doble ambiente neural y mesenquimal durante el desarrollo podría influir en la especificación y multipotencia de los progenitores del órgano que persisten hasta la vida adulta. No obstante, aún no está totalmente aclarado si las células madre del CB, las células tipo II, provienen del ganglio cervical superior formando parte de los progenitores de células glómicas, o por el contrario provienen de las células mesenquimales de la pared de la tercera arteria branquial, lo que explicaría su fenotipo mesenquimatoso.

En resumen, el CB deriva de la zona craneal de la cresta neural, la zona más versátil, y lo hace a partir de progenitores neurales que aterrizan en un ambiente mesenquimatoso. Todo ello podría explicar la enorme plasticidad de diferenciación que presentan las células madre de este quimiorreceptor periférico.

4.4. Uso del cuerpo carotídeo en terapia celular

Las NCSCs que persisten en el organismo adulto manteniendo su multipotencia, como es el caso de las células madre del CB (Annese et al., en revisión; Macías et al., 2014; Pardal et al., 2007), constituyen una interesante fuente celular donde estudiar esa plasticidad de diferenciación y su papel en la fisiología de los tejidos adultos. La multipotencia que conservan las CBSCs adultas representa un potencial uso en terapia celular frente a la enfermedad de Parkinson (PD, del inglés *Parkinson's disease*). El CB ha sido utilizado exitosamente en trasplante intracerebral en modelos animales de PD (Muñoz-Manchado et al., 2013; Toledo-Aral et al., 2003; Villadiego et al., 2005). Además, las células glómicas del CB producen grandes cantidades del factor neurotrófico GDNF (del inglés *glial cell line-derived neurotrophic factor*), que estaría involucrado en el efecto protector y regenerador del CB en la terapia celular anti-

parkinsoniana (Villadiego et al., 2005). Sin embargo, el auto-trasplante de CB a pacientes con PD ha generado tan sólo un modesto beneficio clínico, probablemente debido, entre otros factores, a la poca cantidad de material disponible en un CB humano (Mínguez-Castellanos et al., 2007). Por ello, la expansión *in vitro* del CB a partir de células madre adultas posee un interés clave en la terapia celular frente a la PD (Ortega-Sáenz et al., 2013; Pardal et al., 2007). Las CBSCs no sólo generan células neuronales sino que dan lugar a derivados mesectodérmicos, tales como músculo liso o endotelio (Annese et al., en revisión). Por tanto, la aplicación clínica de las células madre de CB frente al parkinson depende de un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la toma de decisiones de linaje de esos progenitores. El bloqueo farmacológico de la diferenciación mesectodérmica de las CBSCs *in vitro* podría aumentar el rendimiento de producción de células glómicas, ricas en dopamina y GDNF, ambos necesarios para la terapia celular anti-parkinsoniana. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral pueden contribuir a la elaboración de nuevos protocolos para inhibir el linaje mesectodérmico en el CB, favoreciendo el neuronal. El linaje mesectodérmico es el menos estudiado dentro del CB, debido entre otras razones a la falta de herramientas y marcadores específicos para detectar estos tipos celulares.

4.5. Análisis de expresión génica por microarray con células del CB

Las NSCs poseen especial interés (Cameron y McKay, 1998; Gage, 1998; Temple y Álvarez-Buylla, 1999) no sólo por su importancia durante el desarrollo y en la fisiología de los tejidos adultos, sino también por su potencial terapéutico en el tratamiento de distintas enfermedades (Gage et al., 1995). Sin embargo, la falta de marcadores para aislarlas apropiadamente *in vivo* del resto de células de los tejidos en los que residen ha supuesto durante muchos años un obstáculo importante para su estudio (Morrison et al., 1999). Afortunadamente, el desarrollo de nuevas técnicas en los últimos años ha permitido hallar proteínas que permiten purificar NSCs de tejidos embrionarios y adultos (Corti et al., 2007; Morrison et al., 1999; Pardal et al., 2007). La mayoría de los ensayos de enriquecimiento en progenitores se realizan mediante citometría de flujo (FACS, del inglés *fluorescence-activated cell sorting*) con anticuerpos específicos. Sin embargo, es imprescindible encontrar nuevos marcadores moleculares específicos, que permitan purificar a las células madre, y no sólo enriquecer una población celular determinada. En la actualidad se han desarrollado

estrategias experimentales que abordan el problema de la falta de marcadores. Una de estas estrategias es el uso de *microarrays*, con los que se ha estudiado la expresión génica y los perfiles genéticos de los diferentes tipos celulares de la SVZ (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014). Esta técnica permite conocer mejor las rutas moleculares de las que depende la biología de estas células, y descubrir nuevos marcadores de superficie que mejoren su manipulación y aislamiento.

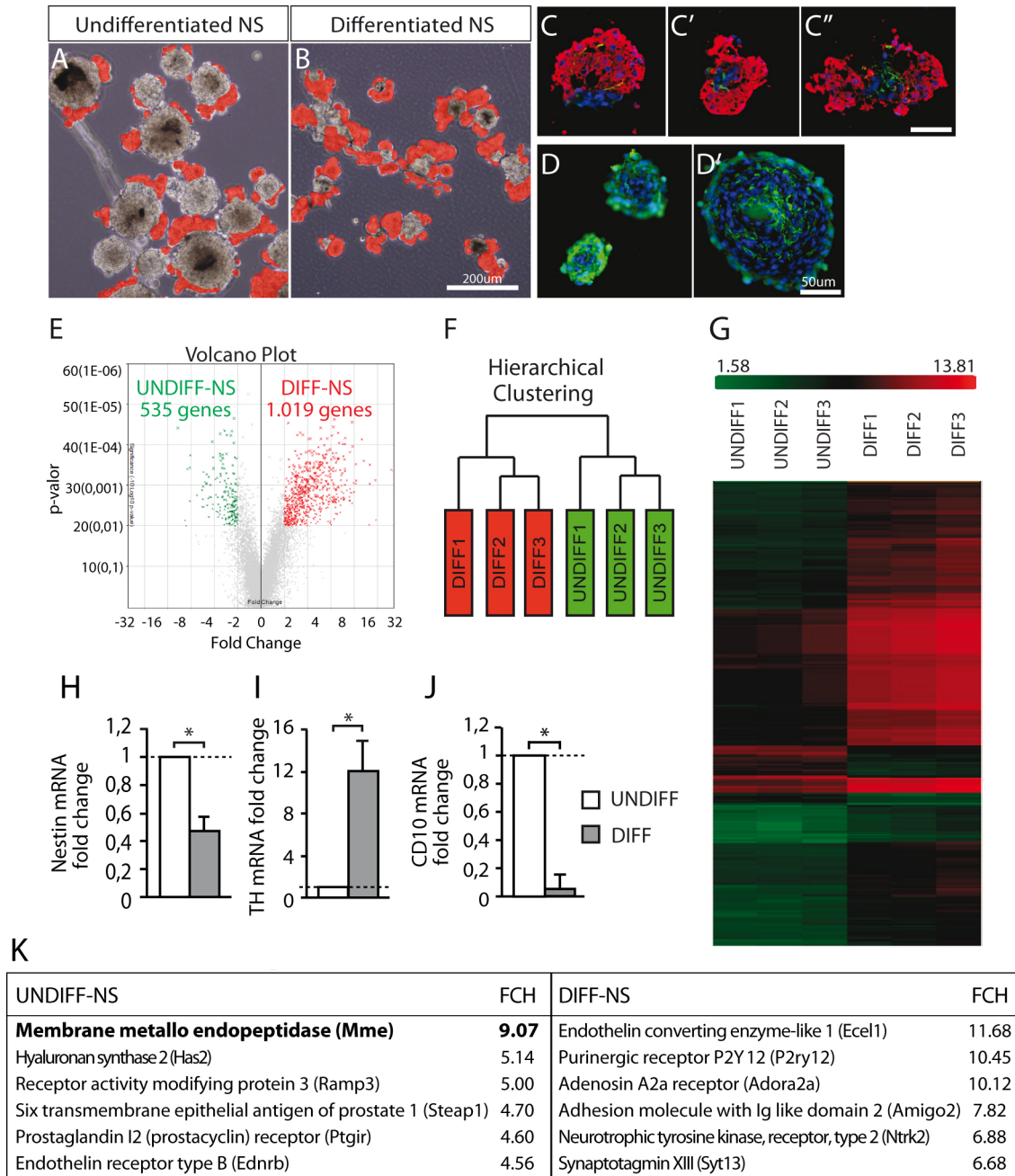
Al igual que las células madre neurales del CNS, las células madre del CB expresan GFAP (Doetsch, 2003; García et al., 2004; Seri et al., 2001). Al activarse estas células durante la hipoxia, comienzan a expresar otro filamento intermedio, la Nestina, convirtiéndose así en progenitores intermedios proliferativos en el órgano. Además de estas proteínas específicas del citoesqueleto, no se conocen otros marcadores de superficie para las CBSCs, lo que dificulta su aislamiento y el estudio de la biología de estos progenitores. En ausencia de marcadores, el único método del que disponemos para trabajar con los progenitores de CB es el ensayo de formación de neuroesferas (NS) *in vitro*.

El ensayo de NS ha sido utilizado en nuestro grupo para llevar a cabo un análisis de expresión génica por *microarrays* (Figura 5) (Platero-Luengo, 2014b). Este análisis se hizo anterior e independientemente de la presente tesis doctoral. En la aproximación llevada a cabo para analizar las CBSCs se decidió utilizar NS enriquecidas en la región progenitora (células indiferenciadas), muestra a la que se denominó *UNDIFF-NS* (del inglés *undifferentiated*), y comparar su expresión génica mediante chips de *microarray* con una población de NS enriquecidas en células dopaminérgicas (células tipo I), muestra a la que se denominó *DIFF-NS* (del inglés *differentiated*) (Figura 5).

Como se ha descrito previamente en la Introducción, las NS de cuerpo carotídeo están formadas por una esfera central (*core*) con progenitores (Nestina⁺), rodeada de pequeños glomérulos de células neuronales (*blebs*, TH⁺) (Figuras 5A-D). La proporción de progenitores *versus* células neuronales puede ser modificada a través de las condiciones de cultivo. Aunque las muestras utilizadas en el *microarray* no están compuestas por poblaciones celulares puras, el análisis genético de NS permite extraer información valiosa sobre la biología del CB y sus distintos tipos celulares. Igualmente, el *array* es útil para encontrar marcadores que permitan la separación de células tipo II y/o de otros progenitores del CB adulto. El análisis de expresión diferencial que se

utilizó en el presente estudio para la búsqueda de marcadores de superficie seleccionaba los genes mediante dos parámetros o filtros: una diferencia de expresión mínima de dos veces (en inglés *fold change*, FCH) ($FCH \geq 2$), y un p-valor ajustado (FDR, del inglés *false discovery rate*) $< 0,01$ (Platero-Luengo, 2014b), lo que asegura significación en las diferencias. Así se obtuvo un listado de genes altamente expresados en cada población de neuroesferas. En la muestra *UNDIFF-NS* se obtuvieron 535 genes de interés y 1.019 genes en el caso de la muestra *DIFF-NS* (Figura 5E). Continuando con nuestro objetivo de búsqueda de marcadores de células progenitoras de CB, y tras analizar las proteínas de membrana más expresadas en ambas condiciones del *microarray*, centramos nuestra investigación en un marcador de superficie altamente expresado en la condición indiferenciada, llamado CD10 o neprilisina (Figuras 5J y 5K). Este marcador de membrana obtenido del *microarray* nos ha permitido llevar a cabo el presente trabajo de tesis doctoral de aislamiento y caracterización de una subpoblación de progenitores neurales en el CB.

Para abordar el primer objetivo de esta tesis doctoral se estudiaron los genes que codifican proteínas integrales de membrana de la muestra indiferenciada, pues esta estaba enriquecida en progenitores de CB. En la figura 5K podemos observar los genes de las proteínas de membrana integrales más expresadas en las *NS-UNDIFF* y *NS-DIFF*, ordenados en función de la expresión diferencial (FCH). Entre los genes con mayor diferencia de expresión en la muestra diferenciada se encuentran la enzima convertidora de endotelina (*Ecel1*), una proteína involucrada en el procesamiento de la ET-1, citoquina liberada por las células tipo I (Platero-Luengo, 2014b; Platero-Luengo et al., 2014a). También se encuentran dos receptores de neurotransmisores (*P2ry12*, *Adora2a*), una molécula de adhesión (*Amigo2*), un receptor de factor neurotrófico (*Ntrk2*), y una proteína implicada en sinapsis (*Syt13*). Estas proteínas reflejan cómo las neuroesferas enriquecidas en células neuronales expresan genes relacionados con diferenciación neuronal y sistema nervioso. La muestra diferenciada se sometió a hipoxia (10% O₂) y se trató con medio de cultivo sin mitógenos. Estas condiciones han permitido que las células madre de CB sufran una diferenciación hacia el linaje neuronal, tal y como se perseguía con las condiciones de cultivo aplicadas.



Sin embargo, en las NS indiferenciadas, muchas de las proteínas integrales con mayor expresión diferencial están implicadas en la biología de las células madre, de acuerdo con el enriquecimiento en progenitores que se había perseguido en esta condición. La proteína de membrana con mayor diferencia de expresión en esta muestra es la metalo-endopeptidasa de membrana (*Mme*), también denominada CD10, neprilisina o CALLA (Kenny et al., 1989; Maguer-Satta et al., 2011a). Los siguientes genes son la hialuronano sintasa 2 (*Has2*), una enzima implicada en la producción del hialuronano, y *Ramp3*, proteína modificadora de la actividad del receptor 3 de adrenomedulina (Dumont et al., 2002; Muff et al., 2001). Otro gen con alto FCH es el antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata (*Steap1*), que ha sido descrito en células madre de origen mesenquimal (Vaghjani et al., 2009). El receptor de prostaglandina I2 (*Ptgir*) también está involucrado en la biología de diversas células madre (Hoggatt et al., 2009). Por último tenemos el receptor de endotelina tipo B (*Ednrb*), que aparece sobreexpresado en las NS indiferenciadas. Esta condición está enriquecida en CBSCs, que por resultados anteriores en nuestro grupo sabemos que son altamente sensibles a la ET-1 y que expresan altos niveles de este receptor (Platero-Luengo, 2014b; Platero-Luengo et al., 2014a), por lo que tiene sentido que aparezca este marcador en la condición *UNDIFF-NS*.

Con los genes más expresados en cada muestra también se llevó a cabo en nuestro grupo un análisis funcional mediante el programa IPA (*Ingenuity pathway analysis*), el cual proporciona información sobre rutas de señalización, funciones biológicas (biofunciones), redes moleculares y procesos biológicos. Este programa agrupa las biofunciones en diferentes Categorías (Figura 6A), las cuales recogen biofunciones similares y ofrecen una visión más general de los procesos que tienen lugar en cada condición. Las NS diferenciadas presentan numerosos procesos relacionados con la sinapsis neuronal y el sistema nervioso (Figura 6C). Por el contrario, las NS indiferenciadas revelan funciones implicadas en el movimiento celular, desarrollo embrionario y proliferación celular (Figura 6B).

Además de los procesos biológicos propios de progenitores, en las NS indiferenciadas aparecen otros procesos relacionados con el linaje mesectodérmico de la cresta neural. Estas funciones hacen referencia a tejidos derivados de dicha estructura germinal, tales como músculo liso, tejido vascular, conectivo, y óseo, reafirmando la multipotencia de las CBSCs y el origen embrionario de estos progenitores. La presencia

tan destacada de estas biofunciones en las *UNDIFF-NS* indica que está teniendo lugar cierta especificación hacia el linaje mesectodérmico en el núcleo de las neuroesferas enriquecidas en progenitores (Platero-Luengo, 2014b), como se discutirá más adelante.

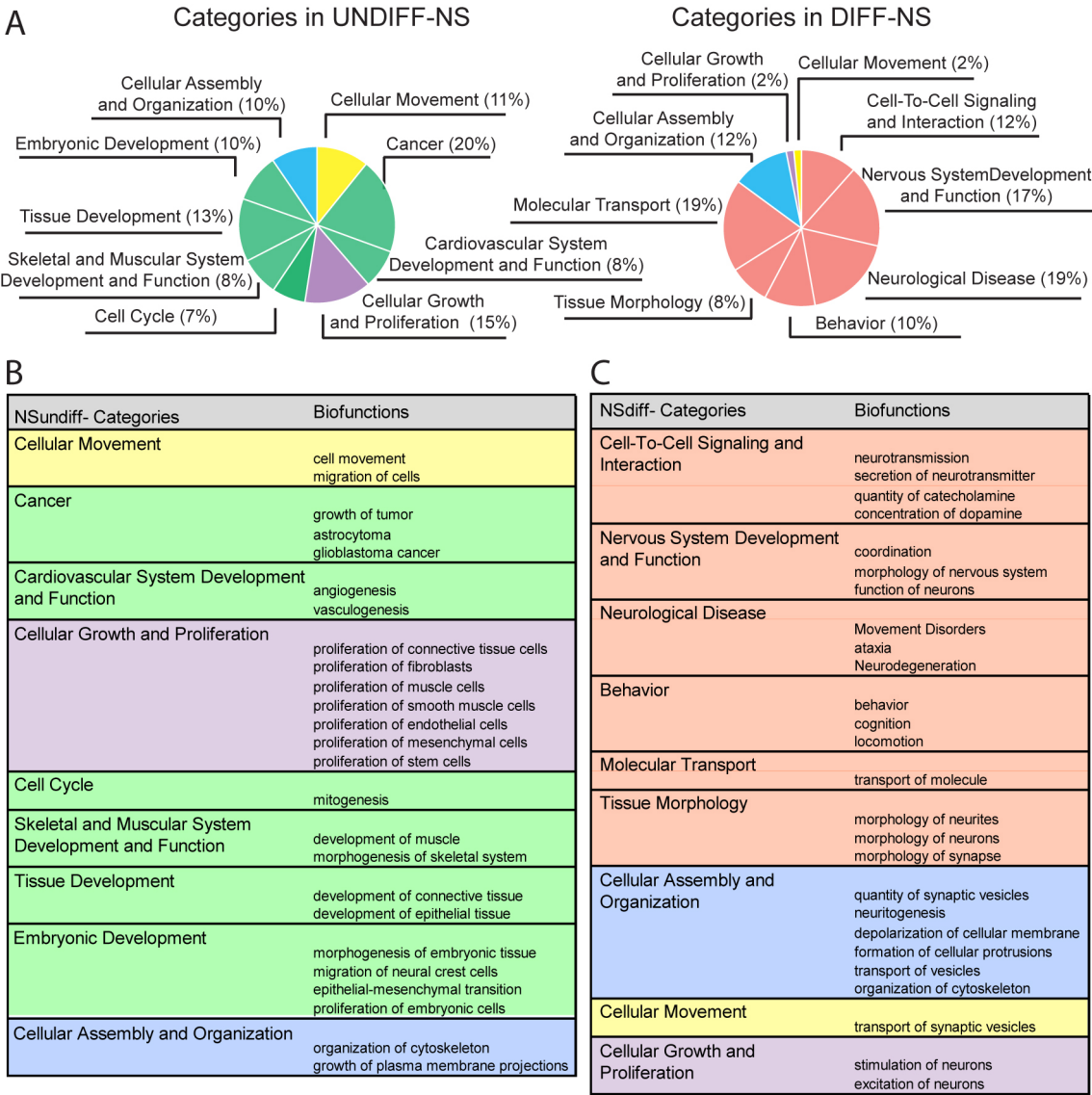


Figura 6. Análisis IPA de biofunciones. **A**, Diagramas de sectores con las categorías más representativas en cada muestra del *microarray*. **B**, Categorías de ambas condiciones, las de *NS-UNDIFF* engloban biofunciones envueltas en proliferación y diferenciación de células mesenquimales, mientras que las categorías de *NS-DIFF* describen funciones claramente neuronales. Tomado de Platero-Luengo, et al. 2014b.

Como se puede ver en la figura 6A, entre las categorías más representativas de la condición indiferenciada se encuentran movimiento celular, cáncer, desarrollo del sistema cardiovascular, proliferación y ciclo celular, o desarrollo del sistema muscular y del esqueleto; todas ellas pertenecientes al ámbito proliferativo o al linaje mesectodérmico. Por otro lado, en la muestra diferenciada (neuronal) las categorías

principales difieren: desarrollo del sistema nervioso, enfermedades neurológicas, comportamiento, o transporte molecular entre otras. Sin embargo, en la condición DIFF-NS podemos ver también algunas categorías que aparecen igualmente en la condición indiferenciada, como movimiento celular, o crecimiento y proliferación, aunque estén representadas en menor medida. En todos estos casos, cuando analizamos las biofunciones asociadas a estas categorías comunes, vemos que difieren enormemente, siendo en el caso de las DIFF-NS funciones relacionadas con el sistema nervioso, tales como transporte de vesículas sinápticas (en movimiento celular), o estimulación de neuronas (en crecimiento y proliferación celular) (Figura 6B). Por tanto, el análisis detallado de los datos de expresión corroboraron de nuevo las diferencias entre ambas muestras de cultivo y aseguraron la validez del estudio.

Los datos obtenidos en este análisis confirman que los progenitores del CB son progenitores multipotentes, capaces de generar células de fenotipo neural y células de fenotipo mesectodérmico, y que se requieren señales específicas del microambiente para promover la diferenciación hacia los diferentes linajes (Platero-Luengo, 2014b). Hemos demostrado previamente que la modificación de las condiciones de cultivo pueden inducir a la célula madre del CB a especificarse hacia un linaje celular u otro.

5. CD10 o neprilisina

La proteína CD10 constituye una metalo-endopeptidasa que regula la acción fisiológica de gran variedad de péptidos, degradándolos y disminuyendo así la concentración extracelular disponible para la unión al receptor correspondiente (Li et al., 1995). Esta enzima de membrana fue identificada por primera vez como “proteínasa neutral de las microvellosidades de células epiteliales de riñón” (EC 3.4.24.11; NEP) (Kerr y Kenny, 1974a), y fue re-descubierta independientemente como “encefalinasas”, tras las evidencias aparecidas sobre una enzima en cerebro que inactivaba la encefalina (Malfroy et al., 1978). La enzima CD10 ha sido utilizada como marcador de linfocitos por estar presente en la mayoría de leucemias linfoblásticas agudas, por lo cual recibió también el nombre de CALLA (del inglés *common acute lymphoblastic leukemia antigen*) (Greaves et al., 1975). Años después, estudios genéticos revelaron que

CALLA, encefalinasa, y endopeptidasa neutral, eran en realidad la misma proteína (Shipp et al., 1989). En 1984 CALLA fue designada con el código “CD10” (*Cluster of Differentiation number 10*) (Bernard y Boumsell, 1984), denominación que utilizaremos en el presente estudio, conjuntamente con el de neprilisina.

5.1. Expresión, isoformas y estructura de CD10

La proteína CD10 está codificada por el gen *Mme* (del inglés *Membrane metallo-endopeptidase*; Gene ID 24590), y se localiza en el brazo q31 del cromosoma 2. Es una proteína ampliamente expresada en muchos tejidos como riñón, cerebro, pulmón, médula ósea, próstata o intestino.

En rata existen tres isoformas del mRNA de CD10 (tipo 1, 2a y 2b) (Figura 7A) (Rush y Hersh, 1982), resultado del *splicing* alternativo, y que presentan una expresión específica para cada región y/o célula (D'Adamio et al., 1989; Li et al., 1995). En regiones como cerebro de rata, se han descrito tres transcritos de CD10, que codifican para proteínas con actividad catalítica similar, casi idéntica, pero expresados cada uno en una región específica (Rush y Hersh, 1982). Otros órganos como el riñón expresan las tres isoformas en todas las células renales (Li et al., 1995).

La proteína CD10 resultante consta de 749 aminoácidos (aa) (750 aa con la metionina de inicio). La secuencia está altamente conservada entre especies, con una elevada homología (>93%) entre rata y conejo, y sólo seis aminoácidos no conservados entre humano y rata (Erdos y Skidgel, 1989). Se trata de una glicoproteína integral de membrana tipo II, con una pequeña cola citoplasmática (extremo N-terminal; 27 aa), un dominio hidrofóbico que ancla la proteína a la membrana plasmática (23 aa), y un gran dominio catalítico extracelular (extremo C-terminal; 700 de los 749 totales) que contiene el sitio activo de la enzima, con una zona de unión asociada a zinc (Malfroy et al., 1987) (Figura 7B). Los modelos de estructura secundaria de CD10 sugieren una disposición tridimensional en la que el sitio activo está compuesto por 400 aa formando una bolsa o saco central (Figura 7C) (Maguer-Satta et al., 2011a; Turner y Tanzawa, 1997).

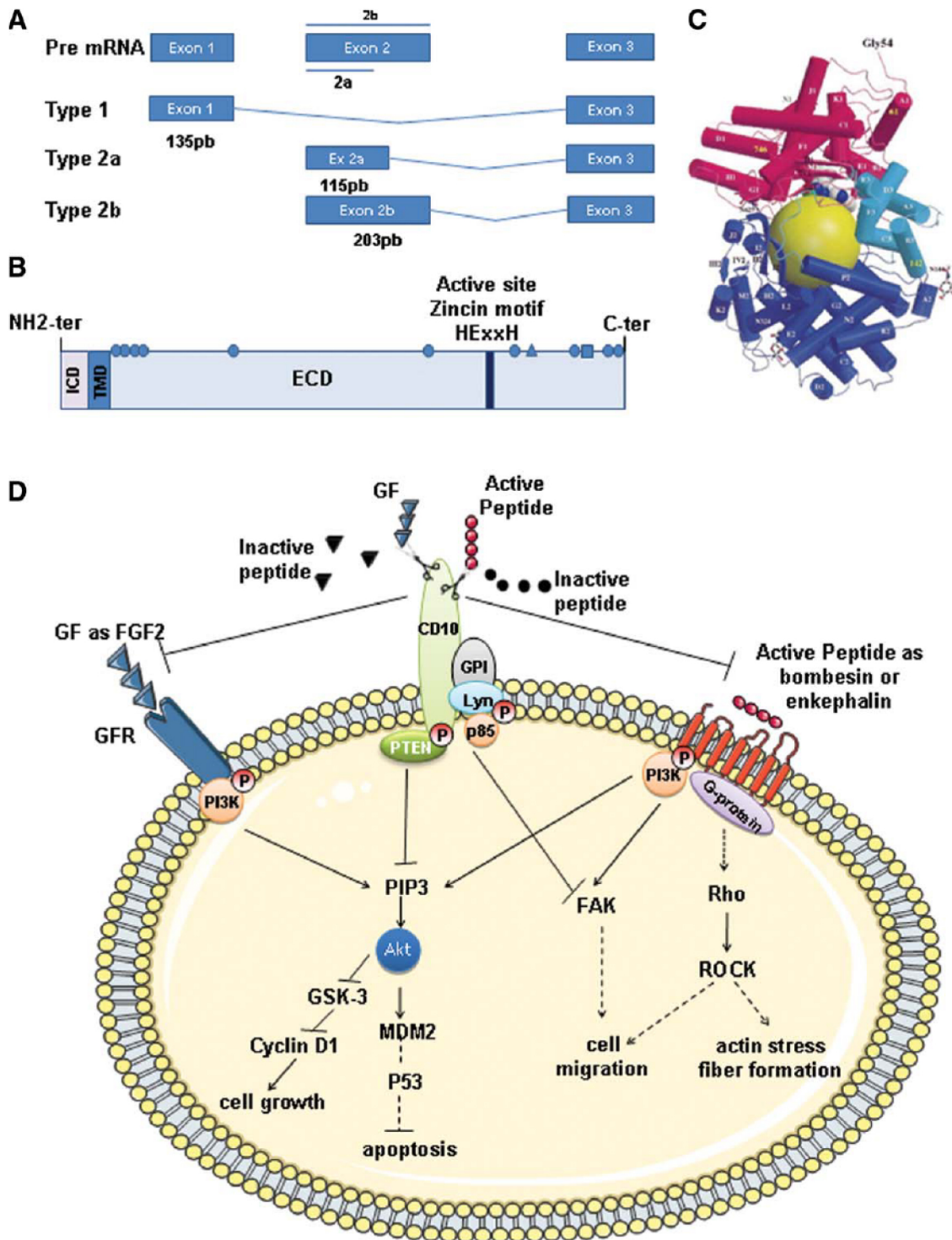


Figura 7. Caracterización del gen y proteína CD10. **A**, Esquema del gen *Mme* con las regiones de *splicing* 5'. **B**, Esquema de la secuencia primaria de CD10; dominio NH2-terminal citoplasmático (ICD), dominio transmembrana (TMD) y dominio extracelular (ECD) en extremo C-terminal, que contiene el sitio activo, con un dominio asociado a Zn “HExxH” (rectángulo negro). **C**, Esquema de la estructura secundaria de CD10, el volumen del sitio activo está representado por una esfera amarilla. **D**, Diagrama de la proteína CD10 en la célula. Tomado de *Maguer-Satta et al. 2011*.

5.2. Modificaciones post-traduccionales de CD10

Mme codifica una glicoproteína de 90-110 kDa (Malfroy et al., 1988; Malfroy et al., 1987; Turner y Tanzawa, 1997), debido a modificaciones post-traduccionales como la glicosilación (LeBien y McCormack, 1989). CD10 se caracteriza por la presencia de diversos sitios de N-glicosilación (Devault et al., 1987) y contiene grandes cantidades de ácido siálico (Johnson et al., 1984). Además, se ha descrito que cambios en la cadena glucídica de la glicoproteína afectan a su estabilidad y a su actividad enzimática (Lafrance et al., 1994). El extremo carboxilo terminal de CD10 posee el dominio “CAAX”, que le permite sufrir otras modificaciones como la endoproteólisis o la metil-esterificación (Fu y Casey, 1999).

5.3. Funciones de CD10

CD10 tiene dos mecanismos de acción a través de dos dominios distintos: el dominio proteasa en el exterior celular, que inactiva péptidos del medio extracelular e impide que lleven a cabo su función señalizadora, y el dominio intracelular, que regula procesos como proliferación, diferenciación y migración celular mediante señalización interna (Figura 7D).

Tras su descubrimiento en riñón, se demostró que CD10 también se expresaba en el sistema nervioso (Erdos y Skidgel, 1989), mayoritariamente en neuronas pero también en oligodendrocitos, en astrocitos (Marcel et al., 1990; Waksman et al., 1986b), en células de Schwann del sistema nervioso periférico (Kioussi y Matsas, 1991; Matsas et al., 1986), así como en el sistema nervioso entérico (Roques et al., 1993). La actividad proteasa de CD10 está implicada en la fisiología del CNS y del PNS mediante degradación de neuropéptidos, siendo uno de los primeros descritos la encefalina (Malfroy et al., 1978; Roques et al., 1993). Este factor es un péptido opiáceo liberado por las neuronas en respuesta al dolor. El descubrimiento de inhibidores de CD10 como el Tiorfan (*Thiorphan* en inglés) (Roques et al., 1980), del cual hablaremos más adelante, ha permitido confirmar el papel de esta peptidasa en la inactivación de encefalina y otros péptidos, tales como neurotensina (Mumford et al., 1981), oxitocina, o la sustancia P (SP), de la familia de las taquininas, que posee efecto vasodilatador mediante la inducción de histamina, serotonina y bradiquinina (Maguer-Satta et al., 2011a). CD10 es también una de las enzimas degradadoras del péptido amiloide A β , y

polimorfismos en su gen (Helisalmi et al., 2004) o disfunciones en la parte enzimática (Iijima-Ando et al., 2008), pueden influir negativamente en pacientes con Alzheimer.

CD10 también está presente en el sistema inmune; se ha localizado en la membrana plasmática de los neutrófilos, donde regula su activación mediante degradación de péptidos inflamatorios (Shipp et al., 1991). Se expresa también en células pre-B y células estromales de médula ósea, lo que sugiere que tiene un papel en las fases tempranas del desarrollo de los linfocitos B (Roques et al., 1993). Además, participa en respuestas quimiotácticas, fagocitosis, procesos inflamatorios y analgesia periférica (Roques et al., 1993).

Neprilisina también se expresa, aunque transitoriamente, durante el desarrollo de órganos sensoriales como el ojo o los bigotes (Roques et al., 1993), o en tejidos epiteliales, como pulmón (Sunday et al., 1992) o mama (Atherton et al., 1994), sugiriendo que también tiene un papel en la morfogénesis de estos tejidos. En mama, por ejemplo, CD10 se expresa en células mioepiteliales (Atherton et al., 1994), y está implicado en el desarrollo de las glándulas mediante el control de la proliferación, la diferenciación celular, y de la transición epitelio-mesénquima a través de la degradación de taquinina (Kenny et al., 1989).

CD10 ha sido utilizado como marcador de célula madre en muchos tejidos sanos. Pero además, en tejidos tumorales se utiliza como marcador de diagnóstico y prognosis. Es el caso del cáncer de hígado, pulmón, próstata, mama (Maguer-Satta et al., 2011a), o cuello (Fukusumi et al., 2014). Además, la separación de células CD10⁺ ha permitido enriquecer en células formadoras de esferas en distintos sistemas, considerándose una herramienta útil para identificar poblaciones de células madre o progenitores en nichos en los que anteriormente no era posible detectarlos (Bachelard-Cascales et al., 2010). La actividad proteasa de CD10, degradando péptidos específicos, tiene un papel dual, manteniendo la reserva de progenitores e impidiendo su diferenciación hacia células maduras en un gran número de tejidos (Kenny et al., 1989; Salles et al., 1993). En conjunto, todos estos datos indican que CD10, a través de su función enzimática, podría tener un papel importante en el nicho como regulador del comportamiento de las células madre. En el presente trabajo de tesis doctoral hemos analizado el papel de esta proteína en la fisiología del nicho neurogénico y angiogénico del CB, para averiguar si influye

en el comportamiento de las células progenitoras en este importante quimiorreceptor periférico, un papel hasta ahora no descrito para la neprilisina en el CB.

5.4. Funciones de CD10 descritas en cuerpo carotídeo

La neprilisina es la principal endopeptidasa del tejido quimiorreceptor del CB (Grasemann et al., 1999; Kumar, 1997), con una actividad proteasa muy superior a las otras peptidasas presentes en el órgano, hecho que indica su relevancia. El uso de inhibidores como el Fosforamidón o el Tiorfan señala que CD10 juega un papel crucial en la respuesta a hipoxia del CB de mamíferos (Kumar et al., 1990), puesto que la inhibición de CD10 aumenta esta respuesta (Kumar et al., 2000a). Neprilisina está considerado como un importante regulador de la respuesta de las células tipo I a la hipoxia aguda (Grasemann et al., 1999; Kumar, 1997). El mecanismo de acción no se conoce con exactitud, aunque su situación dual, en la membrana celular de ciertas células pero también en el medio extracelular del parénquima neural, sugiere que actúa degradando péptidos secretados por las células tipo I (como encefalina, sustancia P, o endotelinas) (Kumar, 1997), previsiblemente afectando a las sinapsis quimiorreceptoras entre estas células y los nervios sensitivos aferentes. Este tipo de mecanismo está igualmente descrito en el CNS, concretamente en el área sináptica entre neuronas sinaptotálámicas (Roques et al., 1993).

Uno de los factores mejor descritos en el CB es la sustancia P (Grasemann et al., 1999), la cual es capaz *per se* de inducir la respuesta ventilatoria. Pues bien, CD10 parece tener un papel regulador en esta inducción (Kumar et al., 2000a). También se ha descrito que la dopamina podría interaccionar con CD10, modulando el metabolismo de neuropeptidos en el CB (Kumar et al., 2000b), pero son necesarios más estudios que corroboren estos hallazgos.

Las células madre adultas residen en nichos específicos que les proporcionan el ambiente propicio para mantener su multipotencia y su capacidad de auto-renovación (Platero-Luengo et al., 2014a). Estas células se encuentran normalmente en un estado quiescente que las protege del estrés celular. Los mecanismos por los cuales estas células se activan selectivamente, para abandonar la quiescencia y diferenciarse hacia células maduras, continúan sin resolverse en la mayoría de nichos adultos (Chell y Frisén, 2012; Suda et al., 2011) y también en el cuerpo carotídeo. CD10 tiene un papel

en la regulación de progenitores en nichos adultos, como es el tejido mamario, determinando el abandono de la quiescencia de estos progenitores y su consecuente diferenciación (Maguer-Satta et al., 2011a). Además de la acción de la neprilisina liberada al medio extracelular para degradar neuropéptidos implicados en la respuesta a hipoxia en el CB, no se sabe si CD10 tiene un papel en la regulación de progenitores del nicho, similar al que desempeña en otros sistemas (Maguer-Satta et al., 2011a). Se desconoce si esta es una de las funciones que tiene esta peptidasa en los progenitores CD10⁺ en el CB adulto. Tampoco se ha caracterizado con detalle la subpoblación de células positivas para CD10 en el CB, por tanto se desconoce la naturaleza de estas células. El estudio de la expresión celular de CD10 en el CB, y el papel de esta proteína en la regulación del comportamiento de los progenitores del órgano, son dos de los principales aspectos que se han estudiado en la presente tesis doctoral.

Objetivos

Objetivos

1. Optimización de la manipulación de células madre del CB a través de métodos de separación y aislamiento.
2. Estudio del papel de factores del nicho del CB en la regulación de la proliferación y diferenciación de las CBSCs.
3. Estudio y caracterización de la población de células CD10⁺ del cuerpo carotídeo.
4. Estudio del papel de la proteína CD10 en la fisiología del cuerpo carotídeo.
5. Estudio de la regulación de CD10 por hipoxia.
6. Efecto de la endotelina-1 en los progenitores CD10⁺.

Materiales y métodos

Materiales y Métodos

1. Animales

Se han utilizado ratas Wistar y ratones C57 modificados genéticamente, con edades comprendidas entre 3 y 8 semanas para las ratas, y de 6 a 8 meses en los ratones. Los roedores fueron estabulados y suministrados por el Animalario de la Universidad de Sevilla y por el Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). La estabulación se realizó en jaulas ventiladas, con temperatura constante ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), con ciclos alternantes de luz-oscuridad de 12 h, y con libre acceso al alimento y al agua. Para el manejo experimental y su posterior sacrificio los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina, a una dosis de 80/10 mg/kg. Ambas drogas fueron suministradas por la Farmacia del Hospital Virgen del Rocío. Todos los animales fueron manipulados y tratados de acuerdo a la guía de cuidado de animales de laboratorio del Consejo Comunitario Europeo (86/609/EEC). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación con animales de la Universidad de Sevilla.

El modelo genético de ratón utilizado ha sido GFAP-CRE/ROSA26, con el fin de corroborar que las células CD10^{+} provienen de las células madre del cuerpo carotídeo (CBSCs).

1.1. Tratamiento de hipoxia crónica mediante cámaras isobáricas

Los animales han sido sometidos a hipoxia crónica (10% O_2) durante diferentes periodos de tiempo (2; 4; 7 ó 21 días). Para ello se colocaron las jaulas en una cámara hermética isobárica (Coy Laboratory Products, Inc.). Ésta posee controladores de O_2 y CO_2 , así como de temperatura y de humedad. Además se utilizó un medidor externo de O_2 y CO_2 para comprobar que las cámaras funcionaban correctamente. Debido a la existencia de una esclusa con doble puerta, estas cámaras pueden manipularse sin que se alteren las condiciones del interior. Tras sacrificar los animales expuestos a hipoxia, se les determinó el hematocrito por centrifugación de la sangre en un capilar sin heparina (Hirschmann Lab.) a 5000 rpm durante 5 min (dos capilares por animal). Se utilizó el mismo número de machos y hembras para salvar variaciones debidas al sexo.

2. Técnicas histológicas

2.1. Inclusión de tejidos y corte

Los tejidos extraídos del animal fueron lavados en PBS frío e incluidos en resina criopreservante OCT (Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences) en moldes de plástico (Cryomold, Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences), congelados rápidamente en hielo seco y posteriormente guardados en el congelador a -80°C hasta su corte. Las muestras se cortaron con un criostato (Leica) con temperaturas en torno a -17°C (cámara) y -24°C (muestra). Se realizaron cortes seriados de 10 µm que fueron recogidos en portaobjetos adherentes (Superfrost Plus, Thermo Scientific) y congelados a -20°C hasta su uso para inmunohistoquímica.

2.2. Preparación de tejidos frescos

Según el anticuerpo con el que íbamos a hacer la inmunohistoquímica de muestras de cuerpo carotídeo (CB) o de neuroesferas (NS), se realizó una fijación específica;

- Fijación con paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4%. Se extrajeron los portaobjetos del congelador e inmediatamente se aplicó PBS durante 30 min para hidratar los tejidos. Después se aplicó PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente (RT) y se hizo un lavado de 10 min con PBS para rehidratar la muestra.
- Fijación con acetona (Sigma). Se extrajeron los portaobjetos del congelador e inmediatamente se sumergieron en acetona fría (a -20°C) y se incubaron durante 10 min, todo dentro del congelador. Tras este tiempo, los portaobjetos se secaron al aire durante 15-30 min para dejar evaporar la acetona.
- Fijación con metanol (Sigma). Se extrajeron los portaobjetos del congelador e inmediatamente se sumergieron en metanol enfriado (-20°C) durante 10 min a RT. Después se realizó un lavado de 10 minutos con PBS para rehidratar la muestra.

3. Cultivos celulares

3.1. Medios y soluciones

Tyrode 2Ca^{+2} 1Mg^{+2} o solución de extracción

STOCK	Concentración final	Cantidad para 1 L
NaCl	140 mM	8,64 g
KCl	4.7 mM	0,15 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1 mM	0,6 g
HEPES (Gibco)	10 mM	2,38 g
Glucosa (Sigma)	5 mM	1,8 g
pH = 7.4		

Solución de dispersión de cuerpo carotídeo

STOCK	Concentración final	Cantidad para 1 ml
Tripsina (Sigma)	0,3 mg/ml	10 µl
Colagenasa tipo II (Sigma)	0,6 mg/ml	10 µl
Elastasa porcina (Calbiochem)	0,35 U/ml	10 µl
CaCl ₂ 5 mM	50 µM	10 µl
PBS (Gibco)		1 ml

Solución de dispersión de neuroesferas

STOCK	Concentración final	Cantidad para 1 ml
Papaína (Worthington)	1,43 mg/ml	35 µl
Colagenasa tipo II (Sigma)	3,96 mg/ml	66 µl
Elastasa porcina (Calbiochem)	0,35 U/ml	10 µl
HBSS (Gibco)		1 ml

Medio completo o medio de proliferación

STOCK	Concentración final	Cantidad para 500 ml
FBS (Gibco)	15%	75 ml
B27 (Gibco)	2%	10 ml
N2 (Gibco)	1%	5 ml
P/S (Gibco)	1%	5 ml
FGF2 (R&D Systems)	20 ng/ml	500 µl
EGF (R&D Systems)	20 ng/ml	20 µl
IGF-1 (R&D Systems)	20 ng/ml	100 µl
DMEM/F12 (Gibco)		395 ml

Medio de diferenciación

STOCK	Concentración final	Cantidad para 100 ml
FBS (Gibco)	15%	1 ml
B27 (Gibco)	2%	2 ml
N2 (Gibco)	1%	1 ml
P/S (Gibco)	1%	1 ml
DMEM/F12 (Gibco)		81 ml

FACS o medio de neutralización

STOCK	Concentración final	Cantidad para 500 ml
P/S (Gibco)	1%	5 ml
HEPES (Gibco)	10 mM	5 ml
BSA (Sigma)	2 mg/ml	1 g
H ₂ O Milli-Q		5 ml
Leibovitz's L15 (Gibco)		440 ml

3.2. Disección y dispersión de tejidos

Se extirparon siempre las dos bifurcaciones carotídeas de la rata o ratón y fueron preservadas en Tyrode frío durante toda la extracción de los cuerpos carotídeos. Para la disección de los CB se utilizaron pinzas y tijeras de iridectomía (World Precision Instruments) y se visualizaron con una lupa (Olympus SZX10). El número aproximado

de células que posee un CB de rata adulta es de 30.000-60.000, por lo que el número de animales utilizados dependió del número de células necesarias para los cultivos. Los CB se dispersaron mediante incubación en botes de centelleo con la solución enzimática y agitación en un termoagitador (Thermomixer Comfort, Eppendorf) a 37°C y 600 rpm durante 25 min. Se han utilizado unos 400 µl de solución enzimática por CB y se han dispersado en un mismo bote un máximo de 6 CB. Después de ese tiempo, se dispersó el tejido unas 30 veces pipeteando con la pipeta P1000, hacia arriba y abajo suavemente y sin formar burbujas que dañasen a las células por tensión superficial. Posteriormente se neutralizaron las enzimas con 10 ml de FACS y se pasaron a un tubo de 15 ml. Seguidamente se centrifugó a 300 g durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante dejando unos 500 µl de solución. Tras homogeneizar el volumen resultante se calculó la densidad celular mediante cámara de *Neubauer* (Una Health) y se sembraron las células en placas o frascos de cultivo. Los CB procedentes de ratón se diseccionaban y dispersaban siguiendo el mismo protocolo.

3.3. Cultivo de CBSCs en condiciones de no adherencia: Ensayo de neuroesferas

El ensayo de formación de neuroesferas se utilizó para aislar los progenitores del CB, ya que es un tipo de crecimiento típico de progenitores neurales. Las células obtenidas de la dispersión del cuerpo carotídeo fueron sembradas en placas de 6 pocillos (*Ultra low binding Plate*, Corning), las cuales están tratadas para tener baja adherencia. El medio de cultivo que se ha utilizado ha sido medio completo (ver apartado 3.1), cada pocillo se cubría con 2 ml de medio y se dejaban equilibrar las placas en el incubador antes de sembrar las células. Se sembraba un número fijo de 10.000 ó 20.000 células por pocillo, dependiendo del tipo de experimento. Nunca se superaba la densidad de 20.000 células por pocillo para evitar la agregación y permitir el crecimiento clonal de las CBSCs formadoras de neuroesferas. Las placas se incubaron a 37°C y al 5% de CO₂, y al 21% ó 3% de O₂ dependiendo del ensayo, durante 10 días en un incubador dedicado exclusivamente a cultivos primarios (8000 WJ, Thermo Scientific). Con el número de células sembradas y el tiempo en cultivo utilizados, no era necesario renovar el medio. Pasado el tiempo de cultivo, las NS se fotografiaron con un microscopio invertido Olympus IX-71 y se procesaron de acuerdo a los objetivos de cada experimento.

Para el estudio del efecto de endotelina-1 sobre las neuroesferas de CB, el factor fue reconstituido en agua ultrapura (Sigma) a una concentración de 4 μM y se congeló inmediatamente a -20°C hasta un mes, en pequeñas alícuotas. La ET-1 fue añadida cada dos días al cultivo en dosis de 5 μl por pocillo, para tener una concentración final de 0,01 μM .

La inhibición farmacológica de CD10 se llevó a cabo con Tiorfan (\pm -3-mercaptop-2-benzilpropanoilglicina, *DL-Thiorphan*) (10 μM , Sigma) (Roques et al., 1980). Es un inhibidor selectivo con alta afinidad por el átomo de zinc presente en el sitio activo de la región enzimática de CD10 (David et al., 1999). Tiorfan se disolvió en DMSO (Sigma), por lo que como control, en los ensayos se analizaron en paralelo pocillos a los que se les añadió la misma cantidad de DMSO que los tratados. Tanto Tiorfan como DMSO fueron añadidos a una dilución de 1:1000 debido a su toxicidad a diluciones menores. El Tiorfan es un compuesto muy sensible a temperatura ambiente debido a que posee un grupo sulfhidrilo, por ello las alícuotas se guardaron a -80°C y durante 2 ó 3 meses máximo.

3.4. Cultivo de células adherente de células de CB: cultivo del linaje mesectodérmico del CB

Dado que el presente trabajo de tesis doctoral está centrado en el estudio de lo que parecen ser progenitores restringidos de linaje mesectodérmico, y ser este un linaje con apetencia por el sustrato adherente, pensamos que podríamos amplificar el número de células progenitoras mesectodérmicas mediante el cultivo adherente de células del CB. Tras realizar diversos análisis y caracterizar las células de este cultivo adherente, comprobamos que las condiciones establecidas favorecían las células del linaje mesectodérmico del CB a expensas de disminuir la población del linaje neuronal.

Para llevar a cabo los cultivos en adherente se utilizaron frascos de 25 y 75 mm^2 (Thermo Scientific), que eran tratados con fibronectina (Biomedical Technologies Inc.) a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en determinados experimentos para mejorar la supervivencia y división de las células. El frasco se cubría con 6 ml de medio completo y se dejaba equilibrar en el incubador antes de sembrar las células. Una vez teníamos las células de la dispersión del CB se sembraba un número de entre 50.000-100.000 células. Los frascos se incubaron a 37°C , 21% de O_2 y 5% de CO_2 hasta que las células alcanzaron cerca del 100% de

confluencia, el tiempo de cultivo varió desde 7 a 12 días, dependiendo del número de células sembradas. Si era necesario el medio de cultivo se renovaba cada 7 días. Pasado el periodo de cultivo, las células se fotografiaron con un microscopio invertido Olympus CKX-41 que tenía acoplada una cámara Nikon Digital Sight DS-L3 y se procesaron de acuerdo a los objetivos de cada experimento.

4. Técnicas inmunofluorescentes

4.1. Inmunofluorescencia en secciones de cuerpo carotídeo

Las tinciones inmunofluorescentes se llevaron a cabo en bandejas de incubación opacas para mantener las muestras en oscuridad en todo el proceso. Los portaobjetos extraídos del congelador se fijaron y se depositaron en estas bandejas, y las secciones se cubrieron con PBTX al 0,3% (PBS con Tritón X-100 al 0,3%) durante 5 min. Este lavado se repitió 2 veces y se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas. Para ello, las secciones se incubaron con solución de bloqueo (10% suero de caballo, Gibco; 1% albúmina bovina, Sigma; y 0,3% Tritón X-100, en PBS) durante 1h a RT. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C (ver Tabla 1. Anticuerpos primarios). Cuando la muestra se marcaba con 2 anticuerpos primarios, éstos se podían diluir juntos en la misma solución para ser incubados al mismo tiempo, siempre que se hubiera descartado la interacción entre ambas inmunoglobulinas. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBTX al 0,3%, y la incubación de las muestras con los anticuerpos secundarios (ver Tabla 2. Anticuerpos secundarios) durante 1-2h a RT. Finalmente, se lavaron los anticuerpos secundarios 2 veces durante 5 min con PBTX al 0,3%. Para marcar los núcleos se utilizó DAPI (Biolink) a una concentración de 1:1000 en PBS durante 10 min. Por último, se realizó un lavado con agua destilada para eliminar posibles impurezas, y las muestras se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (Fluoro-gel, Electron Microscopy Sciences) y con un cubreobjetos para su posterior análisis mediante microscopía. Los tejidos fijados con metanol se utilizaron para la detección de CD10, además este anticuerpo se une a un epítipo de membrana y no requiere permeabilización. Por ello, en los pasos que se han mencionado

anteriormente se usaron las soluciones con menos Tritón X-100; al 0,2%, y los lavados fueron realizados con PBTX al 0,2%.

4.2. Inmunofluorescencia en secciones de neuroesferas

Las neuroesferas se recogieron de las placas de cultivo, se incluyeron en OCT, se congelaron, y posteriormente se cortaron en un criostato (Leica, en secciones de 10 μ m). Para ello, se concentraban mediante movimientos circulares en el centro del pocillo, y se recogían con una pipeta P200 con la punta previamente mojada en medio con suero para evitar que las NS se adhirieran a ésta. Se intentó coger sólo las NS, evitando recolectar las células sueltas que quedaban en el pocillo. Las NS fueron recolectadas bajo el microscopio con especial cuidado de no introducir células sueltas u otra material presente en el medio. Las NS se lavaron del medio de cultivo en otra placa con PBS, y seguidamente, se volvieron a recoger, esta vez con una punta P20 y en el volumen más pequeño posible (5-10 μ l). De esta manera se incluyeron en OCT en moldes de tamaño intermedio. Con el molde bajo la lupa, las NS se colocaron en la mitad aproximadamente del bloque, lo más agrupadas posible, para facilitar su posterior corte. Se hizo una pequeña marca en el molde con un rotulador para determinar dónde comenzaban a aparecer las neuroesferas. Los moldes se congelaron sobre nieve carbónica y se guardaron a -80°C. Los bloques se seccionaron como se describe en el apartado 2.1. Al tratarse de tejido sin fijar, los portaobjetos con las secciones se guardaron a -80°C. Para el marcaje con anticuerpos, las rodajas se fijaron como se describe en el apartado 2.2 y se procedió del mismo modo que para las rodajas de CB (ver apartado 4.1 de Materiales y Métodos).

4.3. Inmunofluorescencia de células dispersas de cuerpo carotídeo

Las células dispersas se dejaban adherir sobre cubreobjetos de cristal previamente tratados con fibronectina (Biomedical Technologies Inc.) a 5 μ g/ml en placas de 4 o 24 pocillos. Para tinciones dobles (de membrana e intracelular), se procedía a realizar en protocolo del apartado 5.1 antes de adherir las células al cubreobjetos. Una vez adheridas, las células se fijaron con 500 μ l de PFA en cada pocillo e incubándolos durante 15 min a RT. Después, se retiró el PFA y se lavó 2 veces con PBS durante 5 min. Las células podían almacenarse en este paso. Para ello se dejaban en PBS con

ácida sódica al 0,01%, se sellaba la placa con parafilm y se mantenían a 4°C. Para continuar con la inmunofluorescencia, las células se lavaron 2 veces con PBS-Igepal al 0,01% (Sigma) durante 5 min. El Igepal es un detergente suave, sustitutivo del NP-40, que se usa para permeabilizar las células y minimizar la tensión superficial. A partir de aquí, todos los lavados e incubaciones se realizaron en agitación suave mediante un agitador orbital. A continuación, las células se incubaron con solución de bloqueo para células (10% suero de caballo, 1% albúmina bovina, y 0,1% Igepal, en PBS) al menos 1h a RT, para impedir uniones inespecíficas. Seguidamente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Éstos se lavaron tres veces con PBS, y se procedió a realizar la incubación con anticuerpos secundarios unidos a un fluoróforo, durante 2h a RT, y protegidos de la luz. Los lavados y el bloqueo se realizaron con un volumen de 500 µl/pocillo. Sin embargo, la incubación con los anticuerpos se realizó con un volumen de 180 µl/pocillo, utilizando la mínima cantidad de anticuerpo. Seguidamente, las células se lavaron de nuevo y se incubaron con DAPI durante 10 min para el marcaje de los núcleos. Por último, los cubreobjetos con las células fueron retirados con la ayuda de una pinza y depositados bocabajo sobre un portaobjetos al que se le colocó una pequeña gota de medio de montaje para inmunofluorescencia (Dako). Cuando el medio de montaje estaba seco, los portaobjetos se observaban mediante un microscopio Olympus BX-61, o se guardaban a 4°C para su posterior análisis.

4.4. Adquisición de imágenes

Las imágenes de fluorescencia de rodajas de CB, neuroesferas o células dispersas, fueron adquiridas mediante un microscopio Olympus BX-61 con cámara digital asociada, con los objetivos 20X, 40X y 100X. Se adquirió una imagen de cada canal RGB en escala de grises, y posteriormente se llevó a cabo el montaje de los tres canales de cada foto para el análisis de las imágenes. Todas las fotos fueron guardadas en formato TIFF (Tagged Image File Format), el cual permite la máxima calidad en las imágenes. Para las imágenes de confocal se utilizó un microscopio confocal fluorescente espectral Leica TCS-SP2-AOBS.

4.5. Cuantificaciones celulares y cuantificación del área de expresión

Las cuantificaciones celulares en las imágenes fluorescentes se llevaron a cabo manualmente, con ayuda del *plugin* “Cell counter” del software ImageJ (NIH). La expresión de algunos marcadores de membrana, como CD10 y lectina proporcionan una tinción filamentosa y sinuosa, que forma una red por todo el tejido difícil de cuantificar. Por consiguiente, para el análisis de estos marcadores, utilizamos el área de expresión. Para estos marcadores se elaboró una macro especial en el programa ImageJ, que modificaba el brillo/contraste en cada imagen y la reducía a 8 bits, después asignaba un valor umbral (o *threshold*), definido visualmente, para delimitar los píxeles positivos. De este modo, se obtenía una imagen máscara de la tinción original que se basaba en adjudicar valor 1 ó 0 a cada pixel, siendo 1 expresión del marcador y 0 no expresión. Con estas imágenes binarizadas podíamos analizar dónde se expresaba el marcador, aunque no el nivel de expresión. Posteriormente, se medía el área de expresión en la rodaja de CB o de NS de cada imagen. El área total se establecía utilizando el marcaje DAPI, ya que el parénquima del CB o el área de la neuroesfera pueden definirse fácilmente por la densidad de núcleos que lo forman.

4.6. Ensayos funcionales en cultivos de CBSCs

4.6.1. Determinación de la capacidad proliferativa de las células madre

La capacidad proliferativa de las células progenitoras que componen una neuroesfera se halla a partir del diámetro de dicha NS. Por tanto, analizamos los diámetros de las NS de cada condición de forma manual con la ayuda del software ImageJ (NIH). Cada condición contaba con un mínimo de 3 réplicas, que se correspondían con tres pocillos de la placa de cultivo. Se medía el diámetro de las NS en cada pocillo y se calculaba una media de las réplicas. Esta media poblacional era comparada entre las distintas condiciones del experimento. En cada pocillo había entre 40 y 50 NS, por lo que las comparaciones entre condiciones se hacían, al menos, con la medida de unas 100 neuroesferas.

4.6.2. Análisis de la diferenciación de las CBSCs

Análisis en secciones de neuroesferas

En las neuroesferas de CB, las células dopaminérgicas diferenciadas se distribuyen en el exterior formando unas estructuras abultadas llamadas *blebs*. En cambio, los progenitores se distribuyen por todo el interior de la esfera, pudiéndose hablar de una zona diferenciada y otra zona indiferenciada (llamada *core*), que prácticamente nunca solapan. Para cuantificar la diferenciación neuronal en las NS, se cuantificó el número de células glómicas o tipo I (agrupadas dentro de los *blebs*). Una vez teñidas y fotografiadas las secciones de las neuroesferas, se procedió a la superposición de las fotografías utilizando el programa ImageJ, lo cual nos permitió obtener una imagen final donde se visualizan claramente las células glómicas, pues los núcleos están marcados con DAPI (azul) y el citoplasma de las células con el anticuerpo anti-TH (rojo o verde). El conteo celular se llevó a cabo manualmente, utilizando dicho programa informático, y se calculó la proporción de células positivas para TH con respecto a las células totales (detectadas mediante el DAPI).

El grado de diferenciación mesectodérmica de las NS se detectó mediante inmunohistoquímica contra los marcadores CD10 y GSA I (lectina). Con la ayuda del software ImageJ se elaboró un macro para cada canal y tal y como se explica en la sección 4.5, se midió el área de cada tinción en cada imagen. De esta manera, se cuantificó el grado de diferenciación mesectodérmica inducido por un agente o factor sobre los progenitores de CB.

Análisis en neuroesferas adheridas a sustrato

El cultivo de los progenitores de CB sobre sustrato adherente constituye un fuerte estímulo para su diferenciación hacia miofibroblastos y células de músculo liso. Las NS se sembraron durante 12h en placas tratadas con fibronectina (5µg/ml) para analizar la capacidad de diferenciación hacia el linaje mesectodérmico del CB. Se utilizó medio de diferenciación (sin mitógenos, ver apartado 3.1). Con estas condiciones de cultivo, las NS se adhieren al sustrato y los progenitores que forman la esfera salen y se diferencian. Estas células fueron teñidas con el anticuerpo anti- α -SMA, que se une a la actina de músculo liso α , y con la GSA I (o lectina), que se une a carbohidratos presentes en células endoteliales. Una vez realizada la inmunocitoquímica, las células fueron

fotografiadas y se procedió a la cuantificación de las células positivas para cada marcador. Para la detección del marcador lectina, se consideraron positivas las células GSA I+ que tenían forma alargada, típica del fenotipo endotelial.

5. Citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó para analizar y obtener poblaciones celulares de interés purificadas. Las separaciones celulares se realizaron mediante la técnica FACS y se utilizó un citómetro de flujo de tres láseres MoFlo (DAKO Cytomation) y un citómetro de cinco láseres FACS Aria Fusion (BD Biosciences). Esta técnica detecta la fluorescencia desprendida por un fluoróforo unido en nuestro caso a un anticuerpo secundario, para identificar un tipo celular concreto y separarlo de la mezcla heterogénea de células. Para analizar poblaciones sin separarlas se utilizó un citómetro de seis láseres LSRFortessa (BD Biosciences). Mediante la técnica de citometría de flujo se analizaron tres tipos de muestras: células dispersas a partir de CB completos, células procedentes de la dispersión de NS y células procedentes de las líneas primarias de CB. Las células muertas fueron eliminadas del análisis mediante el marcador de viabilidad 7-AAD (Molecular Probes), para el cual son positivas. En los análisis sin separación a veces se estudiaban marcadores intracelulares, y en estos casos las células necesitaban ser fijadas por lo que se prescindía del 7-AAD. La tinción utilizada para marcadores intracelulares se explica en el apartado 0. En todos los ensayos de citometría se llevaron en paralelo células que servían de controles para los ajustes del citómetro y para comprobar la especificidad del anticuerpo. Uno de estos controles fueron células incubadas únicamente con los anticuerpos secundarios, para poder eliminar la fluorescencia inespecífica de éstos, y el otro control fue un tubo control que lleva las células marcadas sólo con 7-AAD, para establecer los valores negativos de este fluoróforo sin otra interferencia. Antes de pasar las células por el citómetro, todas las muestras se filtraron con membranas de 50 µm de poro (Celltrics, Partec) para eliminar posibles restos y agrupaciones celulares.

5.1. Tinción de marcadores de membrana para citometría de flujo

Las células dispersas se transfirieron de los tubos de 15 ml a los tubos específicos de citometría (de poliestireno y fondo redondo, BD Falcon). En primer lugar se lavaron con 3 ml de solución FACS (ver Soluciones en apartado **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 µl de los anticuerpos primarios diluidos en solución de FACS. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 hora a 4°C, y posteriormente se lavaron con 3 ml de FACS y se centrifugaron de nuevo. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios, PE-donkey-anti-goat IgG para CD10, FITC-goat-anti-mouse-IgM para HNK-1, y PE-rat-anti-mouse-IgG1 para CD31, todos ellos diluidos 1:200 en solución de FACS, durante 30 min, a 4°C y oscuridad. Después, las células se volvieron a lavar y a centrifugar. Por último, las células se incubaron en el marcador de viabilidad 7AAD diluido 1:500 en FACS, y se procedió a su análisis en el citómetro correspondiente.

Las células endoteliales, detectadas mediante el anticuerpo anti-CD31 y mediante la lectina, son sensibles al proceso de dispersión al que son sometidos los CB. Por ello, tras la dispersión, las células fueron cultivadas durante 12h en condiciones no adherentes, y seguidamente se procedió a la tinción de citometría. De esta manera, para estudiar la co-expresión de CD10 con marcadores endoteliales, primero se separaron las células CD10⁻ y CD10⁺, se incubaron, y pasado este tiempo, se procedió a hacer la tinción de los marcadores endoteliales con el protocolo usual. A diferencia de los marcadores endoteliales, los niveles de la proteína CD10 disminuyen 12 horas tras la dispersión, por este motivo, las células CD10⁺ eran siempre separadas recién disperso el CB.

5.2. Tinción doble, de marcador de membrana y de marcador intracelular, para citometría de flujo

Para algunos ensayos, se cuantificó mediante citometría la co-expresión de CD10 con algunos marcadores intracelulares. Para ello, primero se marcaron las células con el anticuerpo anti-CD10, y posteriormente se fijaron con 150 µl de PFA al 4% durante 15 min a RT. Se lavaron con 4 ml de PBS y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4°C. A partir de este paso los lavados se hacían con PBS, ya que las células ya no estaban

vivas. Se eliminó el sobrenadante y se procedió a la tinción con los anticuerpos contra las proteínas intracelulares (GFAP o nestina entre otras). El anticuerpo primario se incubó en solución de bloqueo con un agente permeabilizante para que pudiera atravesar la membrana celular (10% suero de caballo, 1% albúmina bovina, y 0,1% Tritón X-100, en PBS). Según el anticuerpo, la incubación fue de 1 hora a 4°C, o 30 min a RT. A continuación, se lavó con PBS y se procedió al análisis de las células mediante un citómetro LSRFortessa (BD Biosciences).

5.3. Separación de células de cuerpo carotídeo mediante FACS

Las células de CB o de NS fueron separadas mediante citometría de flujo, en todos los casos se utilizó el anticuerpo anti-CD10 para aislar las poblaciones CD10⁻ y CD10⁺. Los cuerpo carotídeos (8-12 CB) o las NS fueron dispersados como se describe en la sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** en cada caso. Las células se conservaron en frío durante todo el proceso de tinción para evitar la internalización del marcador de membrana CD10. En algunas tinciones con CD10, el marcador HNK fue utilizado como marcador negativo para descartar una parte de la población de células neuronales de CB. La cantidad de células recolectadas varió entre experimentos, llegándose a obtener un máximo de 20.000 células de la población limitante.

6. Análisis de expresión de ARN mensajeros

6.1. Extracción de ARN total y retrotranscripción

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante la extracción de ARN total de CB, de NS, de células de líneas primarias de CB, o de células separadas mediante citometría de flujo. La cantidad de material dependió del experimento y del tipo de muestra. La extracción de ARN se realizó con el kit comercial RNeasy MICRO kit (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las medidas de concentración del ARN obtenido se llevaron a cabo en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El cDNA (DNA complementario) se sintetizó inmediatamente después de

obtener el RNA, mediante el kit QuantiTec Reverse transcription kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo a 42°C durante 30 min. El tratamiento de los tejidos, tanto en la disgregación como en el procesado para la extracción del mRNA fue diferente según los casos:

- Cuerpos carotídeos. Se utilizaron de 2 a 6 CB, que fueron extraídos en condiciones libres de RNAsas. El material necesario para la cirugía y la recolección se trató con etanol al 70% y con *RNaseZap* (Ambion), o fue horneado a 240°C durante 4h. Las soluciones utilizadas fueron tratadas con Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) para inhibir las RNAsas. Los CB se recolectaron en un tubo de microcentrífuga libre de RNAsas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta realizar la extracción del ARN. Posteriormente, para extraer el mRNA se disgregó el tejido mediante arena de sílice (Sigma) horneada. Se añadió un poco de arena a los tubos de microcentrífuga, que se mantuvieron en nitrógeno líquido durante el proceso, y con ayuda de un pistilo desechable se trituró el tejido para romperlo. Seguidamente, se retiró el tubo del nitrógeno, se añadieron 350µl de solución de lisis RLT (Qiagen) con 3,5µl de β-mercaptoetanol (Sigma), y se continuó con la trituración. Seguidamente, se decantó la arena mediante un pulso con la microcentrífuga (Eppendorf) y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo, entonces fue homogeneizado con una aguja de 20G acoplada a una jeringuilla de 1 ml, y se volvió a centrifugar para retirar los restos de tejido. A partir de aquí, se siguieron las instrucciones del kit de extracción de ARN del fabricante.
- Neuroesferas. Se utilizaron al menos 2 pocillos de cultivo con NS (con unas 60-100 NS). Éstas eran recolectadas bajo el microscopio con especial cuidado de no introducir células sueltas u otro material presente en el medio. Se pasaron a un tubo de microcentrífuga libre de RNAsas, y fueron centrifugadas a 300 g durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y los tubos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su uso. Posteriormente, para extraer el mRNA se disgregó el tejido mediante arena de sílice (Sigma) horneada.
- Células provenientes del citómetro. Se necesitó un mínimo de 1.000 células y el máximo dependió del rendimiento del proceso de separación, que no fue más de 20.000 células. Éstas se separaron mediante citometría de flujo y se asilaron

directamente en solución de lisis RLT (Qiagen) con β -mercaptoetanol, y se guardaron a -80°C hasta la extracción de mRNA, que se realizó utilizando el kit comercial RNeasy MICRO kit (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

6.2. Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR estándar se realizaron en un Termociclador Professional TRIO (Biometra). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de $25\mu\text{l}$ que contenía tampón NH_4^+ , MgCl_2 a 2mM , dNTPs (Invitrogen) a $0,2\text{mM}$, cebadores a $0,4\mu\text{M}$ (Sigma), 5U de Taq polimerasa (Bioline) y $1\mu\text{l}$ de muestra. Las condiciones de las reacciones fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min , 40 ciclos a la temperatura de alineamiento específica de cada pareja de cebadores, y una extensión final de 5 min 72°C . Se realizó una electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE, National Diagnostic) de los productos de PCR en un gel de agarosa a una concentración determinada por el tamaño del transcrito, en TBE. Las bandas de DNA fueron visualizadas con MIDORI (Labotag) y tampón de carga 10X (Takara). Para determinar el tamaño de las bandas de cada transcrito se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb o 1kb (New England Biolabs). La información sobre los genes analizados y los cebadores se facilita en la Tabla 3 (Oligonucleótidos).

Las reacciones de PCR cuantitativa (*qRT-PCR*, *Real Time quantitative Reverse Transcription PCR*) se realizaron en un termociclador 7900 HT (Applied-Biosystems) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. La detección se realizó con FAST SYBR Green® PCR Master Mix o ensayos TaqMan (Applied-Biosystems), dependiendo del experimento. Cada muestra se normalizó respecto al transcrito de *Hprt1* para realizar la cuantificación relativa de la expresión de cada gen. Las curvas de disociación de los genes mostraron un único pico, demostrando así la especificidad de los cebadores. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$. El cDNA de las muestras se diluyó en agua ultrapura y de esa dilución se usó el volumen necesario para amplificar 20 ng de cada muestra por pocillo, en placas de 96 pocillos (MicroAmp Fast Optical, Applied-Biosystems). Estas placas se mantuvieron en hielo durante todo el proceso, se sellaron con film (Optical Adhesive Film, Applied-Biosystems), y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 min antes de su análisis.

6.3. Análisis de microarrays

6.3.1. Cultivos de neuroesferas para la realización del *microarray*

Los estudios de expresión génica se realizaron a partir de cultivos de neuroesferas de CB para comparar la expresión diferencial de genes entre neuroesferas tratadas con endotelina-1 (ET-1) y neuroesferas sin tratar (CONTROL). Estas dos poblaciones se obtuvieron al cultivar las células dispersas procedentes de CB durante 10 días en dos condiciones distintas, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3. En el caso de las NS-ET-1, las células de CB se sembraron en medio completo (con mitógenos), y se suplementaba con endotelina-1 (0,01 μ M) en días alternos, y en condiciones de normoxia. Para favorecer el crecimiento de las NS-CONTROL se utilizaron las mismas condiciones, a excepción de la adición de la ET-1.

6.3.2. Estudio de expresión diferencial de genes

El análisis de expresión se realizó mediante microarrays GeneChip® Rat Gene ST 1.0 Array de Affymetrix, en la Unidad de Genómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Se analizaron un número estimado de 27.342 genes bien descritos y conocidos. El análisis estadístico de los datos, que fue llevado a cabo por la unidad de Genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), se realizó mediante LIMMA (*Linear Models for Microarray Analysis*) utilizando el programa oneChannel (en R), que es el recomendado para esta plataforma. Se trata de un análisis que aplica un t-test empíricamente ajustado por un test de Bayes.

6.3.3. Validación de los *microarrays*

Los datos obtenidos del análisis de los *microarrays* fueron validados por qRT-PCR mediante el uso de una placa prediseñada conteniendo sondas TaqMan (Applied Biosystem) de un grupo de genes de interés. Estas placas contenían 44 ensayos en duplicado que incluían un control genérico (18S ARN) y tres genes de control endógeno (GAPDH, HPRT1 y GUSB). Los pocillos de estas placas se rellenaron con 20 μ l de muestra obtenidos a partir de la disolución del cDNA procedente de la retrotranscripción de cada cultivo, diluidos 1/14 en agua ultrapura, y se añadió un

volumen de TaqMan Fast Master Mix. Algunos genes se analizaron mediante ensayos con FAST SYBR Green[®] PCR Master Mix (Applied-Biosystems).

6.3.4. Estudio de las funciones biológicas mediante IPA

Los datos de expresión génica de los *microarrays* se han analizado mediante el programa Ingenuity Pathways Analysis (IPA) de Ingenuity System. Este programa ayuda a interpretar el significado biológico de los datos genómicos. IPA utiliza la Ingenuity Knowledge Base, una base de datos creada manualmente por expertos que está basada en la literatura científica, y que es revisada y actualizada continuamente. Para proporcionar los resultados, IPA emplea dos estadísticos, el *z-score* y el *p-value*. El valor de *p-value* es calculado mediante el Test exacto de Fisher y refleja la probabilidad de que la asociación o la superposición entre un conjunto de moléculas importantes del experimento y un proceso dado se deban al azar. Cuanto menor es el valor de *p*, menor será la probabilidad de que la asociación sea debida al azar. El valor *p* no tiene en cuenta el efecto direccional de la expresión de una molécula, es decir si un gen está sobreexpresado o infraexpresado. Sin embargo, el *z-score* tiene en cuenta el efecto direccional de una molécula sobre otra molécula o en un proceso, y la dirección del cambio de las moléculas en el conjunto de datos.

Para este estudio, los genes proporcionados por los *microarrays* fueron seleccionados aplicando un FCH ≥ 2 y una FDR (*p-value* ajustado) $< 0,05$, y se llevó a cabo un IPA Core Analysis. Este análisis ofrece una evaluación de la señalización y rutas metabólicas, redes moleculares y procesos biológicos que están significativamente representados en el conjunto de datos. Los procesos biológicos se definen como Categorías y Biofunciones. Las Categorías agrupan Biofunciones más específicas. Una Biofunción puede estar contenida en una o varias categorías, por lo que para evitar la redundancia se ha mencionado cada Biofunción una sola vez incluyéndose en la Categoría que se pensó más conveniente, teniendo en cuenta su orden de aparición o especificidad.

6.4. Transfección de células dispersas de CB con siRNA

Las células de CB se transfectaron tras 8 ó 12 h en cultivo mediante una mezcla de 4 secuencias de ARN de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*)

distintas para asegurar la interferencia del gen (ver Tabla 3.Oligonucleótidos). Las secuencias que se utilizaron fueron testadas previamente (Tong et al., 2008); concretamente utilizaron el CD10 SMARTpool siRNA (Darmacon). Para los experimentos realizados en esta tesis los oligonucleótidos fueron diseñados y comprados en Sigma. Como ensayo control se utilizaron las secuencias de siControl SMARTpool siRNA (Darmacon).

Los ensayos de silenciamiento génico se realizaron mediante la transfección de oligonucleótidos de siRNA específicos para *Mme* (Tong et al., 2008), estas secuencias disminuyen la expresión de genes mediante la interferencia en el ARNm. Se realizó una curva de dosis/respuesta de siRNA para el siCD10, obteniéndose una dosis óptima de 50 nM. Hay que tener en cuenta que 50 nM es la concentración total de siRNA con la que se transfecta. En esta cantidad tenemos las 4 secuencias de interferencia, por lo tanto, cada secuencia está a 12,5 nM. Se realizó también un curso temporal para comprobar el tiempo que duraba la interferencia, en la figura 18C aparece el *fold change* de la expresión del gen CD10 48 h tras la transfección de las diferentes concentraciones de siRNA.

Para la transfección se usó Lipofectamina2000 (Life-Technologies-Invitrogen). En primer lugar, se diluyó cada mezcla de siRNA (siControl y siCD10) en OptiMEM suplementado con GlutaMAX (Gibco). Paralelamente se mezcló la cantidad adecuada de Lipofectamina®2000 y OptiMEM según el tipo de pocillo, ambas mezclas se incubaron durante 5 min a RT. Después se mezcló el siRNA y la Lipofectamina®2000 diluidos, añadiendo el siRNA diluido al vial con la Lipofectamina2000 diluida. Se homogeneizó todo y se incubó 20 min a RT. Dicha mezcla se añadió al pocillo con las células gota a gota y con cuidado. Las placas se incubaron a 37°C durante 6 h, tras ese tiempo se les añadió medio completo en exceso (2,5 ml por pocillo) para diluir la mezcla. Este medio era sin antibiótico, ya que puede dañar a las células debido a los poros que abre la Lipofectamina®2000 en la membrana plasmática.

Al día siguiente de la transfección se puede comprobar si el vector ha entrado a las células. Debido a que CD10 es una proteína de membrana hicimos experimentos esperando 48 horas para que se tradujera y se translocase a la membrana. Así mismo, en experimentos de formación de NS, que requieren un tiempo total más largo, se esperó sólo 24 h, ya que el efecto del siRNA tiene un tiempo limitado de unos 4 días. Después,

las células se cultivaban durante 5 días para que formaran NS. La bajada en la expresión de los genes se detectó 48 h después de la transfección por qRT-PCR mediante ensayos con FAST SYBR[®] Green (Applied-Biosystems).

7. Separación electroforética de proteínas e inmunodetección (*Western Blot*)

7.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteína total se partió de células cultivadas en placas de 6 pocillos (Nunc). Las células se lavaron dos veces con PBS frío (GIBCO) y se lisaron con 150 µl de buffer de lisis RIPA (Tris pH 7.6 50 mM, EDTA 1mM, 150 mM NaCl, 1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate and 0,02 Protease Inhibitor Cocktail Tablets per ml (Roche)), con jeringa de 25G. Después se incubaron en hielo durante 40 min y se les aplicó vórtex cada 5 min. Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C y los sobrenadantes con las proteínas se recogieron y se cuantificaron directamente mediante el ensayo de Bradford (Sigma). Las muestras de proteína se mezclaron con buffer de carga 5X (100 mM Tris pH 6.8, 36% glycerol, 4% SDS, 0,01% bromophenol blue, 200 mM DTT) y fueron incubados a 95°C durante 5 min y guardadas a -20°C hasta su uso para *Western Blot*.

7.2. Electroforesis SDS-PAGE, transferencia e inmunodetección

Se utilizó la misma cantidad de proteína (30 µg) de cada muestra. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras de SDS (SDS-PAGE). Los geles fueron transferidos a membranas PVDF (tamaño de poro 0,45µm, Millipore) y éstas se incubaron con anticuerpo anti-CD10 (1:200; R&D Systems) y anti-Tubulina-α (1:5000; Sigma), en solución de bloqueo con 5% de leche en polvo desnatada (Central Lechera Asturiana) en TBS-T (Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 100 mM y 0,05% de Tween-20) durante toda la noche a 4°C con agitación. La proteína Tubulina-α se utilizó como control de carga y de transferencia de las muestras. Tras hacer tres lavados con TBS-T de 40 min las membranas se incubaron con anticuerpos anti-Ig Goat-HRP para CD10 y Anti-Ig Mouse-HRP (1:5000; Biomedal) para Tubulina-

α , durante 2 h a RT. El revelado se realizó por luminiscencia utilizando reactivo ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad de las bandas se evaluó por densitometría con el programa Image QuantTL. La densidad óptica de cada muestra fue normalizada con la correspondiente a la banda de Tubulina- α de la misma. En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

8. Análisis estadístico

Los datos estadísticos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). La significación estadística se estimó mediante la prueba t de Student (*t-test*); para el análisis de cultivos celulares se consideraron muestras pareadas, y para los experimentos con animales, muestras independientes o no pareadas.

9. Anexos

9.1. Anticuerpos primarios

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados.

Antígeno	Origen/Tipo	Dilución	Compañía	Referencia
CD10	Cabra/Poli	1:50-1:200	R&D Systems	AF1182
CD31	Ratón/IgG1	1:200	BD Pharmigen	555025
GFAP	Conejo/Poli	1:500	Dako	Z-0334
GFAP (GA5)	Ratón/IgG1	1:300	Cell Signaling	3670
HNK-1	Ratón/IgM	1:500	BD Bioscience	559048
Nestin (rat-401)	Ratón/IgG1	1:500	Millipore	MAB 353
SMA- α	Ratón/IgG1	1:500	Sigma	A2547
TH	Conejo/poli	1:1000	Novus Biologicals	300-109
Tubulina- α (611B1)	Ratón/IgG2b	1:5000	Sigma	T6793

9.2. Anticuerpos secundarios

Tabla 2. Anticuerpos secundarios y marcadores fluorescentes utilizados.

Fluoróforo Anticuerpo	Reactividad	Origen	Dilución	Compañía	Referencia
Alexa-568 IgG	Cabra	Mono	1:500	Life Technologies	A-11057
Alexa-488 IgG	Ratón	Mono	1:500	Molecular Probes	A-11055
Alexa-568 IgG	Ratón	Cabra	1:500	Molecular Probes	A-11004
Alexa-488 IgG	Conejo	Mono	1:500	Molecular Probes	A-21206
Alexa-568 IgG	Conejo	Cabra	1:500	Molecular Probes	A-11036
Alexa-488 IgG	Oveja	Mono	1:500	Molecular Probes	A-11015
R-phycoerithrin (PE) IgG	Cabra	Mono	1:200	Jackson Immuno.	705-116-147
Fluorescein (FITC) IgM	Ratón	Cabra	1:200	Jackson Immuno.	115-096-075
Fluorescein Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (GSA I)	Todos los tipos celulares	Vegetal	1:500	Vector Laboratories	FL-1101
7-Amino-Actinomycin (7- AAD)	Todos los tipos celulares	Químico	1:500	BD Pharmingen	559925
4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI)	Todos los tipos celulares	Químico	1:1000	Invitrogen	D1306

9.3. Oligonucleótidos

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para PCRs y para el ensayo de siRNA.

Fw: *forward*; Rv: *reverse*. as: *antisense* (cadena antisentido).

Secuencia del oligonucleótido	Fuente
CD10 (rat)	
Fw- AATCAGATCGTCTTCCCCGC	Primer-BLAST (NCBI)
Rv- CACCAGTCAACGAGGTCTCC	
TH (rat) Standard PCR	
Fw-GGACATTGGACTTGCATCTCTGGG	Primer Express
Rv-TGAGAAGCAGTGTTGGGAGGATGG	
TH (rat) RT-PCR	
Fw-TCGGAAGCTGATTGCAGAGA	Primer Express
Rv-TTCCGCTGTGTATTCCACATG	
Nestin (rat) RT-PCR	
Fw-TCCCACAAGGCTGTTCTGG	Primer Express
Rv-TTGTGCAGGTGGTAGGCAAG	
Hprt1 (rat) RT-PCR	
Fw-	Primer Express
Rv-	
VEGF (rat) RT-PCR	
Fw-CGTCTACCAGCGCAGCTATT	Primer Express
Rv-TGAGGTTTGATCCGCATGAT	
HIF1α (rat) RT-PCR	
FW-ACACGAGCTGCCTCTTCGA	Primer Express
RV-CAGCCGCTGGAGCTAGCA	
siRNA CD10	
siRNA1-GCAGAAAUCAGAUCGUCUUUU	(Tong et al., 2008)
siRNA1as-AAGACGAUCUGAUUUUCUGCUU	
siRNA2-GAACAAACAUAUGGUACUUUU	
siRNA2 as-AAGUACCAUAUGUUUGUUCUU	
siRNA3-UAACCAAACUUAAGCCUAUUU	
siRNA3 as-AUAGGCUUAAGUUUGGUUAUU	
siRNA4-GUACGGACUUCUUCAAAUAUU	
siRNA4 as-UAUUUGAAGAAGUCCGUACUU	

Resultados

Resultados

A. Análisis de expresión génica e identificación de CD10 como marcador de células indiferenciadas de cuerpo carotídeo

Como ya se expuso en la Introducción, trabajos previos de análisis de expresión génica en nuestro grupo habían identificado a la proteína CD10 como altamente expresada por células progenitoras indiferenciadas del CB. En el presente trabajo de tesis doctoral nos propusimos analizar en detalle la naturaleza de las células positivas para CD10 en el CB, y el papel que esta proteína de membrana podría estar desempeñando en la fisiología del órgano. Para ello, necesitamos primero identificar anticuerpos que nos permitieran aislar y estudiar las células CD10⁺.

1. Detección y aislamiento de células CD10⁺ en el cuerpo carotídeo

1.1. Búsqueda de anticuerpos que reconozcan el marcador CD10 en CB de rata

Teniendo en cuenta las proteínas de membrana que surgieron del análisis de expresión génica llevado a cabo en nuestro grupo (ver Introducción), se buscaron anticuerpos que detectaran estas proteínas y que pudieran utilizarse por citometría de flujo, para facilitar el aislamiento de las células positivas. Sólo se encontraron anticuerpos adecuados para dos proteínas de la lista; CD10 (R&D Systems) y Ramp3 (Santa Cruz Biotechnology). Estos anticuerpos fueron los únicos que cumplían lo requerido, es decir, reconocían el epítipo de rata y podían utilizarse para la técnica de FACS. Como se ha avanzado en la Introducción, CD10 está descrito en diversos tipos de células madre, aunque el papel de esta proteína en la biología de células madre es aún poco conocido (Maguer-Satta et al., 2011a). Por ello, su estudio presentaba un gran interés para nuestro grupo, y de hecho se convirtió en objetivo principal de la presente tesis doctoral. El papel de Ramp3 no está aún descrito en cuerpo carotídeo, sin embargo, el hecho de disponer de anticuerpos específicos para su estudio justificó el análisis preliminar de su expresión que se muestra a continuación.

En primer lugar se verificó si los anticuerpos adquiridos reconocían células de rata, para lo que fueron testados en tejidos en los que está descrita la presencia de células positivas; en el caso de CD10 en riñón e hígado (Li et al., 1995) (Figura 8), y en

el caso de Ramp3 en médula ósea y tálamo (Nagae et al., 2000; Oliver et al., 2001) (Figura 9). La Figura 8 muestra el uso del anticuerpo anti-CD10 para detectar subpoblaciones celulares CD10⁺ en riñón y en hígado. Alrededor de un 20% de las células de riñón, y un 6% de las células de hígado, aparecen como positivas para el marcador (Figura 8A-B).

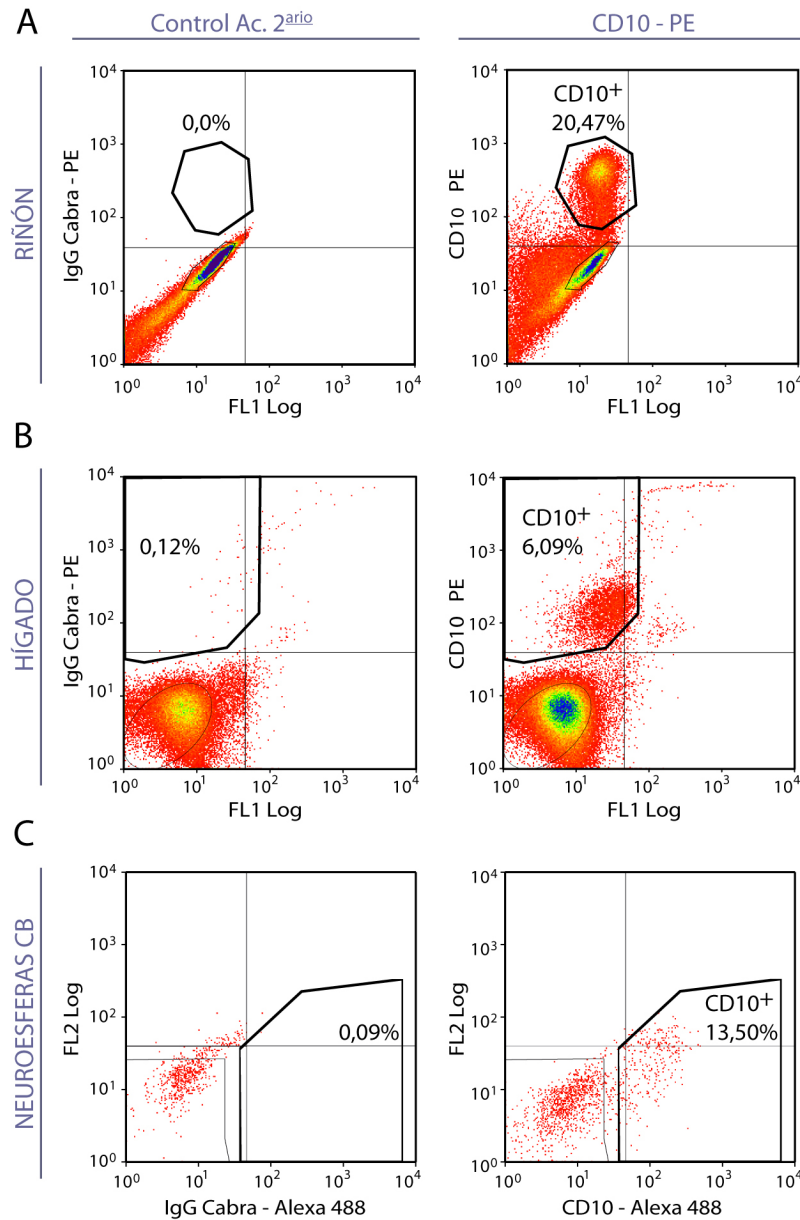


Figura 8. Test del anticuerpo anti-CD10. A-C, *Dot-plots* representativos de la especificidad del anticuerpo secundario (Control Ac. 2°; izquierda), y de la población de células positivas para CD10 detectada (CD10-PE; derecha) en células de: riñón (A), hígado (B), y neuroesferas de CB (C). La detección de una población de células CD10⁺ en neuroesferas sugiere que el anticuerpo está reconociendo progenitores de cuerpo carotídeo.

En ambos casos la población positiva detectada por citometría de flujo está claramente separada de la negativa, lo que indica que el anticuerpo anti-CD10 detecta células positivas de rata de forma correcta. En el caso de CD10, en esta primera prueba de expresión decidimos incluir también células de neuroesferas de CB, que están enriquecidas en células indiferenciadas. La figura 8C muestra que alrededor del 13% de estas células son positivas para CD10, lo que constituye un resultado preliminar interesante sobre la expresión de este marcador en progenitores del CB.

Por otra parte, el anticuerpo anti-Ramp3 no detectó una población clara de células positivas en los tejidos control (Figura 9A-B), por lo que parece que el anticuerpo no reconoce correctamente células de rata. Por todo ello, decidimos centrarnos en CD10 como posible marcador de progenitores de CB, y procedimos a la caracterización de las células positivas para este marcador en el cuerpo carotídeo.

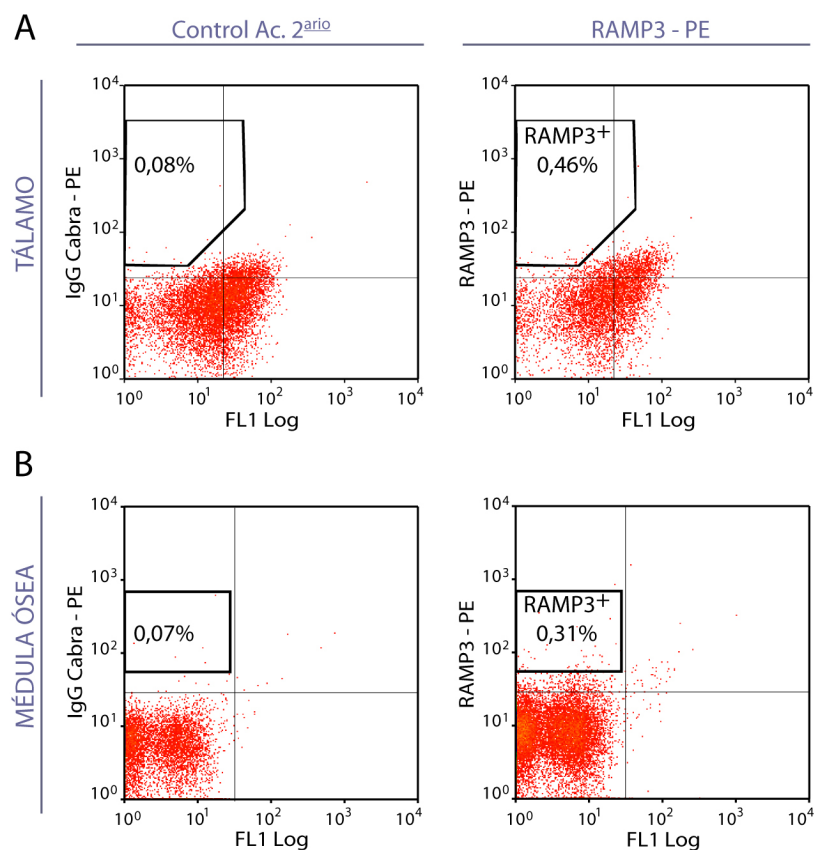


Figura 9. Test del anticuerpo anti-RAMP3. A-B, *Dot-plots* representativos de la especificidad del anticuerpo secundario (Control Ac. 2°ario; izquierda), y la población de células RAMP3⁺ detectada (RAMP-PE; derecha) en células de; tálamo (A) y médula ósea (B). Véase que el anticuerpo anti-Ramp3 detecta un porcentaje muy bajo de células positivas (0,46% en tálamo, y 0,31% en médula ósea), por ello concluimos que el anticuerpo no reconoce correctamente células de rata.

Todas las pruebas preliminares de citometría de flujo con los distintos anticuerpos se acompañaron de tinciones paralelas de las células con el anticuerpo secundario solo, es decir, con el fluoróforo que se utilizará con cada anticuerpo (Figuras 8 y 9). Este tipo de tinción define la unión inespecífica del anticuerpo secundario, y en todos los casos resultaron porcentajes de células muy marginales, lo que garantiza una detección correcta del marcador de membrana.

1.2. Detección de células CD10⁺ en cuerpo carotídeo mediante citometría de flujo

Una vez comprobado el correcto funcionamiento del anticuerpo anti-CD10 en células de rata, se marcaron células dispersas de cuerpo carotídeo con dicho anticuerpo y se analizaron mediante la técnica de FACS (ver Apartado 5.1 de Materiales y Métodos) (Figura 10). Esta técnica utiliza anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos detectables mediante láser, y es una de las técnicas de separación celular más sofisticadas y precisas que existen (Alberts et al., 2002).

Para aislar las células de un tejido sólido es necesario romper la matriz extracelular que las mantiene unidas. El CB es un órgano cuyo parénquima posee un alto contenido en matriz extracelular, mayoritariamente compuesta por colágeno, y además es un tejido altamente irrigado, lo que complica la obtención de una suspensión de células únicas. Por todo ello, para la disrupción del CB es necesario utilizar enzimas proteolíticas que rompan la matriz, como la tripsina y la collagenasa, y también enzimas que disgreguen los vasos sanguíneos, como la elastasa. La dispersión enzimática, unida a la dispersión mecánica que se aplica en paralelo al tejido, hace que la membrana de las células del CB, y por ende las proteínas de membrana, puedan quedar dañadas. Es probable por tanto que con la técnica de citometría estemos subestimando la cantidad de células CD10⁺ presentes en el CB. En cualquier caso, las tinciones para citometría de flujo se acompañan siempre de una tinción con un marcador de viabilidad celular, en nuestro caso la actinomicina (7-AAD). Los días que por alguna razón, el porcentaje de células dañadas 7-AAD⁺ es excesivamente elevado, la preparación no se incluía en el estudio. Para mejorar la dispersión de los tejidos se puede usar también el ácido etildiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante de iones Ca²⁺. Estos iones son importantes para las uniones célula-célula, por lo que al retirarlos se favorece la disgregación celular. Sin embargo, el EDTA es un inhibidor de CD10, por lo que su uso se ha excluido en estos experimentos.

La Figura 10 muestra un típico análisis por citometría de flujo de células dispersas de CB, teñidas con el anticuerpo anti-CD10 conjugado al fluoróforo ficoeritrina (PE, del inglés *Phycoerythrin*). Aproximadamente el 20% de las células de CB son positivas para el marcador (Figura 10A, derecha). El porcentaje de positividad debe ser corregido restándole el porcentaje de células que aparecen positivas en el control del anticuerpo secundario (Figura 10A, izquierda), aunque en este caso, ese porcentaje de no especificidad es prácticamente despreciable. El gráfico de barras de la figura 10B muestra la media de células positivas para CD10, obtenida a partir de 9 preparaciones independientes de CB llevadas a cabo en distintos días. La reducida desviación estándar del porcentaje obtenido, $19,65 \pm 1,37\%$, denota la robustez de la preparación y de la tinción, y la repetitividad de la cantidad de células $CD10^+$ presentes en el órgano.

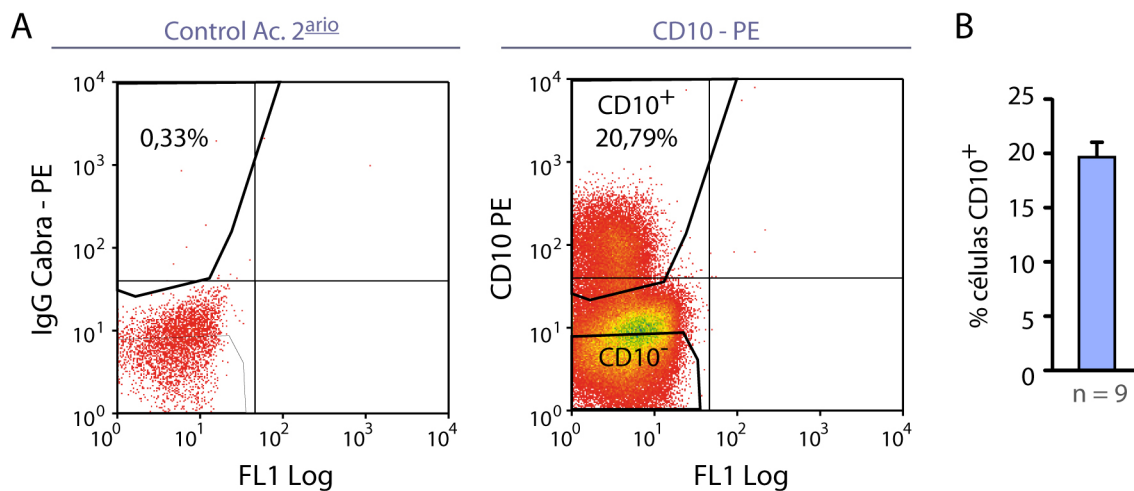


Figura 10. Análisis de células $CD10^+$ de CB mediante citometría de flujo. A, *Dot-plots* representativos en los que se muestra la especificidad del anticuerpo secundario (Control Ac. 2^{ario}, izquierda) y las poblaciones celulares $CD10^+$ y $CD10^-$ (derecha) de cuerpo carotídeo. B, Cuantificación de células $CD10^+$ analizadas mediante citometría de flujo en CB recién disperso (n=9). Este análisis nos confirma el correcto funcionamiento del anticuerpo anti-CD10 y la existencia de una población notable de células $CD10^+$ (en torno a un 20%) en cuerpo carotídeo. Las barras de error indican SEM (del inglés *Standard Error of the Mean*, es decir, la desviación o error estándar de la media).

A continuación, se estudió con detalle la población celular $CD10^+$. En primer lugar se comprobó si las células $CD10^+$ proceden del linaje de la célula madre de CB mediante estudios de seguimiento del linaje celular, y también mediante estudios de co-expresión de CD10 con otros marcadores moleculares descritos en CB como pertenecientes al linaje germinal de la CBSC (GFAP, Nestina, SMA, TH, GSA I, CD31, etc.). También se procedió a analizar la posible existencia de células progenitoras dentro de la población de células $CD10^+$ aislada por citometría, así como las características de estas células.

2. Caracterización de las células CD10⁺ de cuerpo carotídeo

2.1. Inmunodetección de células CD10⁺ *in vivo*

La inmunodetección de la población celular CD10⁺ se llevó a cabo en secciones de bifurcación carotídea de rata mediante tinción inmunohistoquímica. Al contrario que con la técnica de citometría de flujo, con la tinción inmunohistoquímica podemos ver *in situ* la expresión del marcador en tejido intacto, sin necesidad de disgregación mecánica o enzimática. La Figura 11 muestra imágenes representativas de inmunohistoquímica de cuerpo carotídeo en las que se puede observar que la tinción con anticuerpo anti-CD10 en tejido es de tipo filamentosa. En la figura 11A vemos una sección de CB que ha sido marcada únicamente con un anticuerpo secundario Alexa-568 IgG. En esta imagen no aparece ninguna célula positiva para el marcaje de CD10, lo que indica que el anticuerpo secundario no se une inespecíficamente al tejido. Este dato confirma la especificidad del anticuerpo utilizado en la inmunohistoquímica.

En la figura 11B-C se muestran imágenes de inmunohistoquímica de bifurcación carotídea teñidas con anticuerpo primario anti-CD10. Como podemos ver, las células CD10⁺ están extendidas por todo el parénquima del CB, y se encuentran principalmente asociadas a los vasos sanguíneos. La figura 11C muestra una ampliación de la figura 11B en la que podemos observar células positivas para CD10 que forman parte de la pared celular de las arterias (señaladas por las puntas de flecha). A veces los anticuerpos secundarios se unen inespecíficamente a las células vasculares, pero en este caso la señal observada en la figura 11B no aparece en la inmunohistoquímica realizada sólo con el anticuerpo secundario (Figura 11A), lo que indica que es una señal específica. La pared celular de las arterias es una zona característica de células endoteliales y de células de músculo liso. La localización de las células CD10⁺ sugiere que existe una asociación entre estas y los vasos sanguíneos, y que probablemente una gran proporción de las células positivas para CD10 forman parte del tejido mesectodérmico del CB.

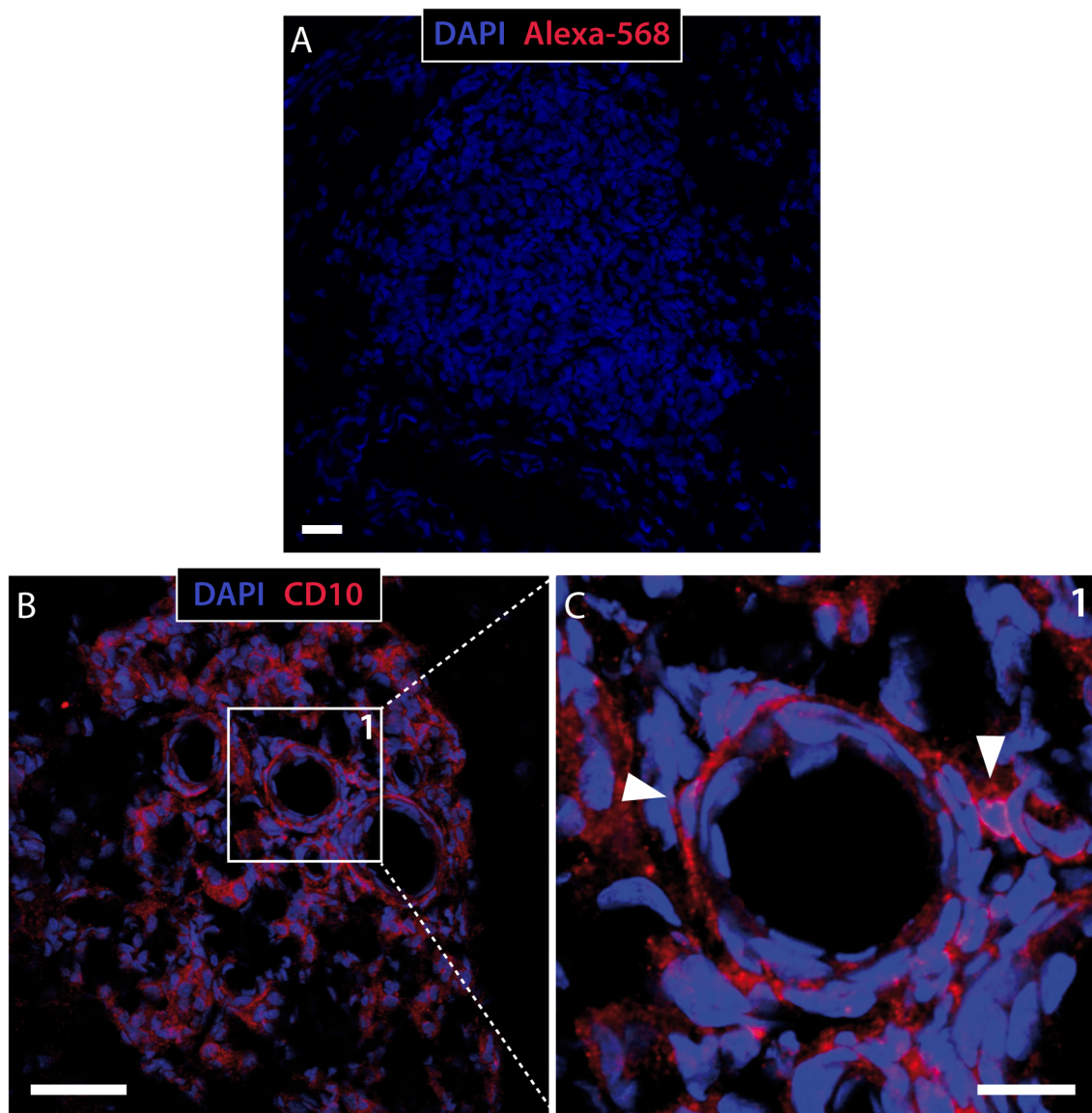


Figura 11. Detección de células CD10⁺ *in vivo* en cuerpo carotídeo. **A**, Inmunohistoquímica control de bifurcación carotídea, sólo con el marcaje del anticuerpo secundario (Alexa-568 anti-cabra), utilizado para detectar al anticuerpo primario anti-CD10 en (B y C). La ausencia de marcaje en (A) indica que el anticuerpo secundario detecta específicamente las células CD10⁺. **B**, Imágenes representativas de inmunohistoquímicas de CD10 en bifurcación carotídea. **C**, Ampliación del área encuadrada en (B). Las puntas de flecha señalan células CD10⁺ asociadas a los vasos sanguíneos. Escalas, 50 μ m en (A y B), y 10 μ m en (C).

2.2. Identificación de las células CD10⁺ dentro del linaje germinal del CB

En primer lugar, se comprobó si la población de células CD10⁺ pertenece al linaje de las células madre del CB mediante técnicas de trazado del linaje celular (en inglés *cell-fate mapping*). El trazado del linaje celular se llevó a cabo con el ratón transgénico B6 GFAP-cre/R26R (*floxed LacZ*). Este ratón transgénico ha sido utilizado en nuestro

grupo anteriormente (Annese et al., en revisión; Pardal et al., 2007) para hacer un seguimiento de la diferenciación de las CBSCs hacia ambos linajes neuronal y mesectodérmico. En la figura 12A podemos ver un diagrama de las construcciones genéticas que posee este ratón, las cuales proceden del cruce de dos ratones: ratón GFAP-CRE y ratón R26R. El diagrama muestra también el funcionamiento del sistema *Cre-LoxP*, cuyo uso está muy extendido para estudios de expresión específica de tejidos. El gen *LacZ* actúa como gen reportero, y el promotor de la recombinasa cre determinará el tejido que quedará marcado. La secuencia genómica situada entre los dos sitios *loxP* será escindida por medio de la recombinación que efectúa la recombinasa, que en este ratón, estará disponible únicamente en las células que expresen o hayan expresado alguna vez el gen *gfap*. El gen *LacZ* codifica la proteína β -galactosidasa (β -gal), enzima que degrada el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), un compuesto orgánico con un grupo indol enlazado covalentemente a un galactósido. El X-gal se utiliza en técnicas de seguimiento del linaje celular y se añade a las células al realizar la inmunocitoquímica. Las células que posean la enzima β -galactosidasa degradan el X-gal y, como consecuencia, se forma un precipitado azul observable en campo claro por microscopía óptica convencional. De esta manera, las células de CB que expresan o han expresado alguna vez el gen *gfap* quedan marcadas. La técnica nos permite localizar células GFAP⁺, y también células que hayan derivado de estas, aunque ya no expresen la GFAP, dado que el evento de recombinación de la cre es irreversible. La parte superior de la figura 12B muestra una inmunohistoquímica de una célula CD10⁺ que es además positiva para X-gal. El precipitado azul que aparece en esta célula indica que es positiva para la expresión de LacZ, y que por tanto se trata de una célula CD10⁺ que proviene del linaje de las CBSCs, que deriva de una célula GFAP⁺. La figura 12B inferior muestra una inmunohistoquímica representativa de una célula de CB marcada con el anticuerpo anti-CD10 y con el anticuerpo anti- β -galactosidasa (Novus Biologicals). Esta célula es CD10⁺ y β -galactosidasa⁺, lo que confirma que las células CD10⁺ derivan de las células madre del CB.

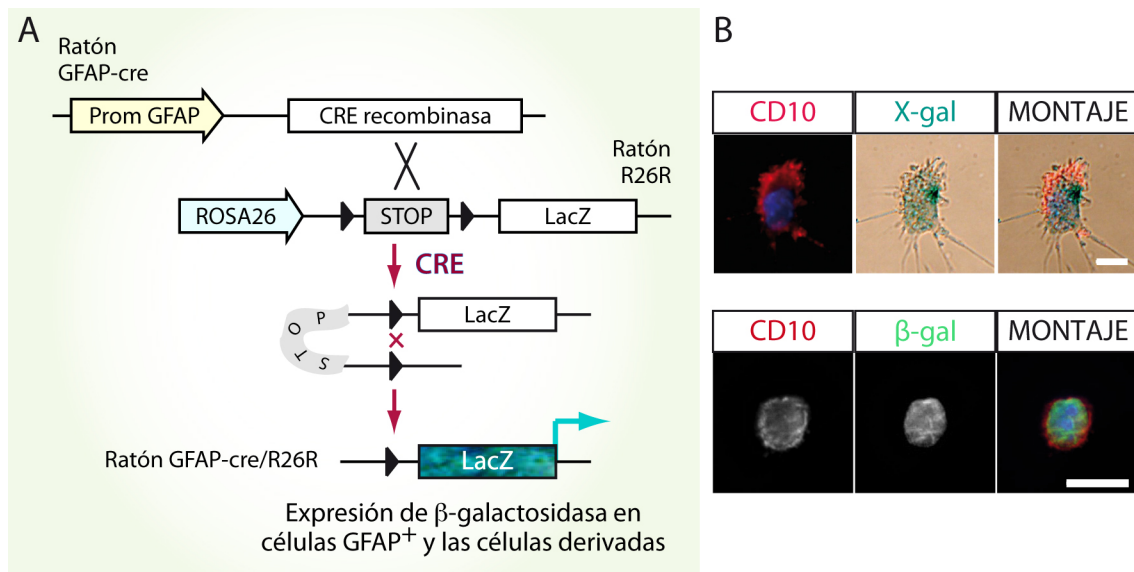


Figura 12. Análisis del linaje celular de las CBSCs que dan lugar a células CD10⁺. A, Diagrama de las construcciones genéticas que posee el ratón GFAP-cre/ROSA26, las cuales proceden del cruce de dos ratones: ratón GFAP-cre y ratón R26R. Adaptado de *Pardal et al. 2007*. B, Inmunocitoquímica de células CD10⁺ de CB de dicho ratón marcadas con X-gal (arriba) o β-galactosidasa (abajo). El montaje muestra la combinación de las imágenes de DAPI, CD10, y X-gal o β-gal. Escalas, 10 μm.

Tras confirmar que la población de células CD10⁺ deriva de las células madre del CB, se llevó a cabo un estudio inmunocitoquímico con células CD10⁺ para comprobar la co-expresión de CD10 con otros marcadores que también pertenecen al linaje de las CBSCs, como son GFAP, Nestina o SMA. Nuestra experiencia previa con inmunohistoquímica para detectar CD10 (Figura 11), para lo cual hubo incluso que poner a punto un protocolo de tinción diferente al protocolo que se utiliza para otros marcadores en este tejido, nos convenció de no utilizar esta técnica para los estudios de co-expresión. Por este motivo, el análisis de co-expresión de CD10 con marcadores del linaje de las CBSCs se realizó mediante inmunocitoquímica *ex vivo*, con células de cuerpo carotídeo recién disperso (ver apartados 4.3 y 5.1 de Materiales y Métodos).

La figura 13A muestra imágenes representativas de la inmunocitoquímica realizada para detectar la expresión de GFAP, Nestina, SMA o TH, en combinación con CD10. Como vemos en la figura 13B, aproximadamente un 25% de las células CD10⁺ co-expresan GFAP (24,8±7,8%). La figura 13C nos muestra que esta cantidad supone el 37,0±16,8% dentro de la población total de células GFAP⁺ de cuerpo carotídeo. La figura 13A muestra también una célula CD10⁺ que co-expresa Nestina, un marcador de progenitor neural. En las cuantificaciones de la figura 13B vemos que el 6,3±1,0% de células CD10⁺ son Nestina⁺. El estudio inmunocitoquímico revela por tanto que existe una subpoblación de células CD10⁺ que co-expresa GFAP, y/o Nestina. Estos resultados

sugieren que dentro de la población $CD10^+$ existe una subpoblación de progenitores del CB.

Por otro lado, se examinó la co-expresión de CD10 con marcadores de diferenciación, como es el caso de la proteína α -SMA, una actina expresada en las células de músculo liso. Estas células se encuentran en las arterias y en los vasos sanguíneos de gran calibre. La figura 13B muestra que un $4,6 \pm 1,2\%$ de las células $CD10^+$ co-expresan α -SMA. Este número indica la proporción de células $CD10^+$ que están diferenciadas, o en proceso de diferenciación, hacia músculo liso. Estas células doble positivas representan, como podemos ver en la figura 13C, el $16,1 \pm 1,4\%$ de las células de músculo liso del CB. Por tanto, además de células progenitoras, dentro de la población $CD10^+$ existe una subpoblación de células de músculo liso, que pertenece al tejido mesectodérmico del CB.

Por último, se llevó a cabo una inmunocitoquímica frente al marcador tirosina hidroxilasa (TH) en combinación con CD10. La figura 13B-C indica que prácticamente no hay células $CD10^+$ que expresen TH, siendo el porcentaje de células doble positivas para CD10 y TH ($CD10^+ TH^+$) de $0,100 \pm 0,002\%$. Un ejemplo de este tipo de tinción se muestra en la figura 13B (última línea de fotos), en la que aparece una célula $CD10^+$ negativa para la TH. Para confirmar este resultado, se analizó la expresión de TH mediante PCR (Figura 13D). En primer lugar se analizó la expresión de TH en células de la línea celular PC12, utilizada como control, ya que es una línea que deriva de feocromocitoma de rata, y posee un fenotipo neuronal dopaminérgico (alta expresión de TH). De acuerdo con el fenotipo de esta línea celular, en la figura 13D podemos ver una banda correspondiente a la expresión de TH en las células PC12. En segundo lugar se muestra la expresión de TH en una línea celular de cuerpo carotídeo desarrollada en esta tesis doctoral (denominada CBA, de “*carotid body adherent*”), y cuya caracterización se expondrá más adelante. La línea CBA posee un fenotipo mesectodérmico, pero presenta un pequeño porcentaje de células TH^+ , lo que explica la pequeña banda observada en estas células. Por último, observamos la expresión de TH en células $CD10^-$ y en células $CD10^+$ del CB, aisladas mediante citometría de flujo. Como puede observarse, las células $CD10^+$ no expresan la tirosina hidroxilasa, mientras que la población $CD10^-$ sí contiene células que la expresan, confirmando los datos observados mediante inmunocitoquímica *ex vivo* (Figura 13A-C). Los resultados obtenidos acerca de la ausencia de expresión de TH en células $CD10^+$ sugieren de nuevo que CD10 no es un

marcador asociado al linaje neuronal del cuerpo carotídeo, sino más bien al mesectodérmico.

A continuación, estudiamos si las células CD10⁺ co-expresaban marcadores endoteliales descritos en el CB, como GSA I y CD31(Annese et al., en revisión)(Annese et al., en revisión). Para llevar a cabo este estudio separamos la población CD10⁺ mediante citometría de flujo e incubamos las células durante 12 horas para que recobraran los marcadores CD31 y GSA I en la membrana plasmática, los cuales se pierden con facilidad durante la disgregación del tejido. Tras estas 12 h en cultivo, las células CD10⁻ y las CD10⁺ se tiñeron con GSA I o CD31, y se analizó el porcentaje de células positivas mediante citometría de flujo.

La lectina o GSA I se une específicamente a carbohidratos de la membrana de las células endoteliales (Bankston et al., 1991; Laitinen, 1987). La figura 13E muestra dos *dot-plots* representativos en los que se observa el marcaje obtenido con GSA I en la población CD10⁺. En el *dot-plot* izquierdo vemos la señal obtenida al añadir galactosa (0,2 M) y lectina. La galactosa es un azúcar al que la lectina se une con gran afinidad, y las moléculas de GSA I que, en lugar de unirse a la galactosa se unan a otras células, lo harán de manera inespecífica. En la figura 13F vemos la cuantificación de células positivas para GSA I dentro de la población CD10⁺, correspondiente a un porcentaje que asciende al 26,8±5,0%.

El marcador CD31, también llamado PECAM-1 (del inglés “*platelet endothelial cell adhesion molecule*”), se expresa en células de endotelio maduro. La figura 13H muestra dos *dot-plots* representativos del marcaje de CD31 en células CD10⁺. En la parte izquierda vemos un *dot-plot* de células CD10⁺ marcadas únicamente con el anticuerpo secundario como control, y en la parte derecha aparece un *dot-plot* con el marcaje de CD31. Los estudios de co-expresión de CD10 con este marcador endotelial se realizaron en paralelo en las poblaciones de células CD10⁻ (aisladas igualmente por citometría de flujo e incubadas 12 h). La figura 13I-J muestra respectivamente los porcentajes de células CD31⁺ presentes en la población CD10⁺ y CD10⁻.

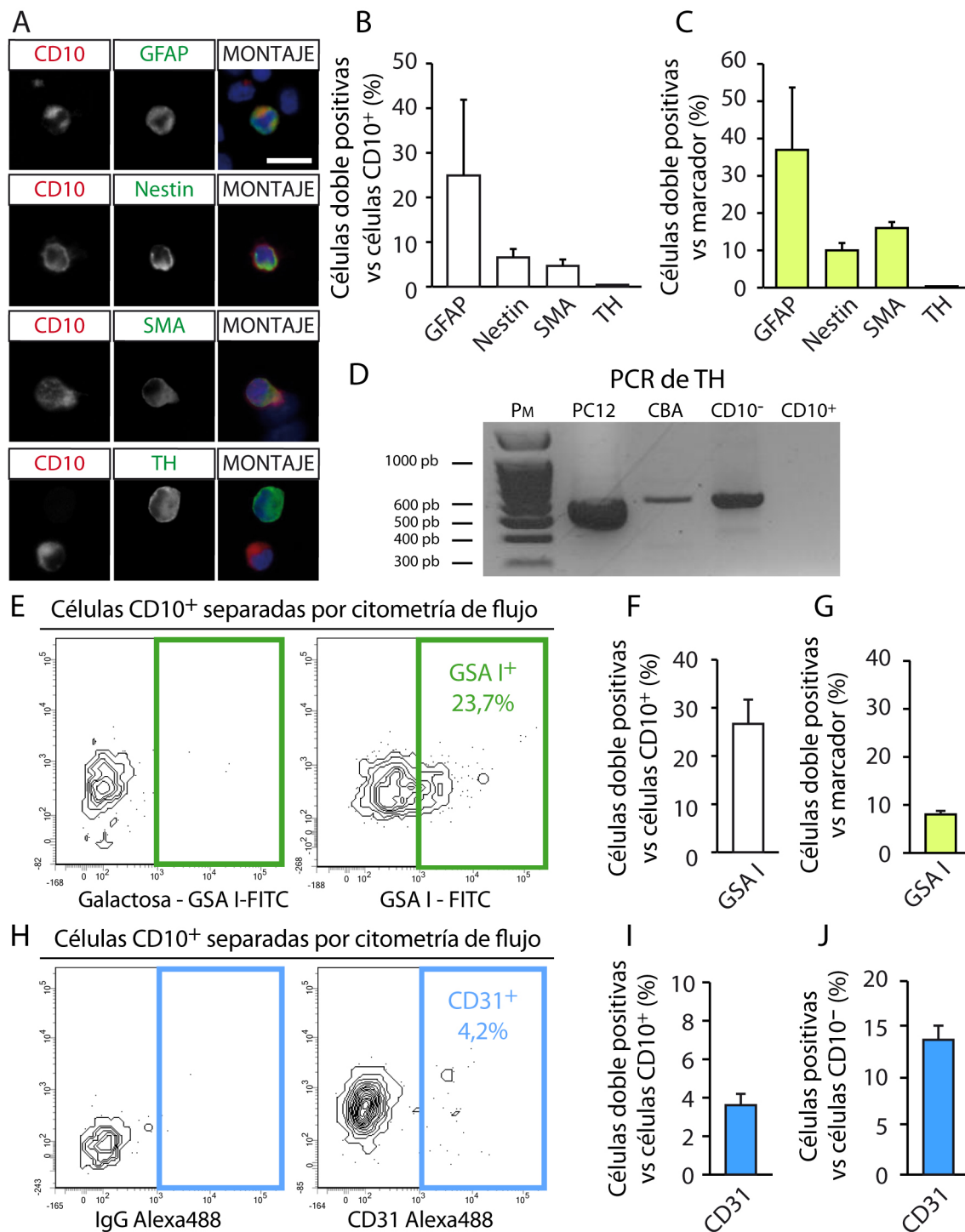


Figura 13. Caracterización inmunocitoquímica de la población CD10⁺ de CB. **A**, Imágenes representativas de inmunocitoquímica de CB disperso. CD10 aparece siempre marcado en rojo. **B**, Cuantificación de células CD10⁺ que co-expresan marcadores del linaje germinal de la CBSC. **C**, Porcentaje de células CD10⁺ dentro de las poblaciones GFAP⁺, Nestina⁺, α SMA⁺ y TH⁺. **D**, Análisis de expresión de TH mediante PCR en células PC12 (células neuronales TH⁺), células de CB cultivadas en sustrato adherente (línea primaria CBA, ver apartado B.3 de Resultados), células CD10⁻ y células CD10⁺ separadas por FACS. Las bandas observadas corresponden a una secuencia de 600pb del gen TH, véase como en las células CD10⁺ no aparece expresión de TH. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,5% y observados mediante Midori. Como marcador de peso molecular se utilizó *DNA Ladder 100pb* (NEB). **E**, *Dot-plots* representativos de células CD10⁺ marcadas con GSA I. **F**, Cuantificación de células mostradas en (E). **G**, Porcentaje de células CD10⁺ en la población GSA I⁺. **H**, *Dot-plots* de células CD10⁺ marcadas con anti-CD31. **I**, Cuantificación de células mostradas en (H). **J**, Cuantificaciones de células CD31⁺ de la población CD10⁻. Escala, 10 μ m.

El análisis inmunocitoquímico realizado indica que en la población celular CD10⁺ existen progenitores neurales de CB (GFAP⁺ y/o Nestina⁺), pero también células diferenciadas, como células de músculo liso SMA⁺, y células endoteliales (GSA I⁺ y CD31⁺). Sin embargo, las células CD10⁺ no parecen expresar nunca el marcador neuronal TH. El estudio de co-expresión junto con la asociación de las células CD10⁺ a los vasos sanguíneos del CB, sugieren que la expresión de CD10 está asociada al linaje mesectodérmico de las células madre de CB.

B. CD10 define una población de progenitores mesectodérmicos en estado latente, preparados para participar en angiogénesis

1. Progenitores CD10⁺: aislamiento y caracterización

La co-expresión de CD10 con GFAP o Nestina, marcadores intracelulares de progenitor neural, sugieren que en la población CD10⁺ existe una proporción de células progenitoras. Para confirmar la presencia de progenitores y poder estudiarlos, se aislaron células CD10⁻ y CD10⁺ mediante citometría de flujo y se sometieron al ensayo de formación de neuroesferas, un tipo de crecimiento típico de progenitores neurales.

Como podemos ver en la Figura 14, un porcentaje de las células CD10⁺ forman NS. Además, la población positiva para CD10 tiene una eficiencia de formación de NS mayor que la población negativa. La figura 14B muestra la cuantificación de la eficiencia de formación de NS, que en la población CD10⁺ es del 1,80±0,19%, y en la población CD10⁻ del 0,54±0,10%. El aumento en esta eficiencia es estadísticamente significativo ($p \leq 0,01$), e indica que la separación mediante CD10 produce un enriquecimiento en progenitores formadores de esferas. Como medida del nivel proliferativo de los progenitores CD10⁻ y CD10⁺, se cuantificó el diámetro del *core* de las NS (Ver apartado 4.6.1 de Materiales y Métodos). Las NS procedentes de progenitores CD10⁺ muestran un diámetro superior (67,3±2,4 μm) al de las NS procedentes de progenitores CD10⁻ (51,8±1,7 μm ; Figura 14C; $p \leq 0,01$). Los diámetros del *core* de las NS han sido representados también como porcentaje normalizado de frecuencias para ver mejor la dispersión del diámetro de las NS en cada población celular. En la figura 14D se observa que las NS procedentes de células CD10⁺ poseen diámetros que oscilan entre 40 y 150 μm , mientras que los diámetros de las NS procedentes de células CD10⁻ apenas alcanzan las 100 μm , mostrando de nuevo un claro aumento en la capacidad proliferativa de los progenitores CD10⁺.

La figura 14E muestra imágenes de campo claro de NS formadas a partir de células CD10⁻ (izquierda) y CD10⁺ (derecha). En estas fotos puede observarse también que las NS de progenitores CD10⁺ son más grandes. Como se ha descrito anteriormente, los progenitores de cuerpo carotídeo tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse *in vitro* e *in vivo* hacia células neuronales TH⁺ (Pardal et al., 2007). Sin embargo, en este

caso observamos que la mayoría de las neuroesferas de progenitores $CD10^+$ no presentan abultamientos o *blebs* (Figura 14E, derecha), caracterizados anteriormente como agrupaciones de células neuronales. En la figura 14F podemos ver dos neuroesferas ampliadas de la figura 14E; la imagen superior muestra una típica NS de progenitor $CD10^-$ en la que aparece pseudocoloreado un *bleb*.

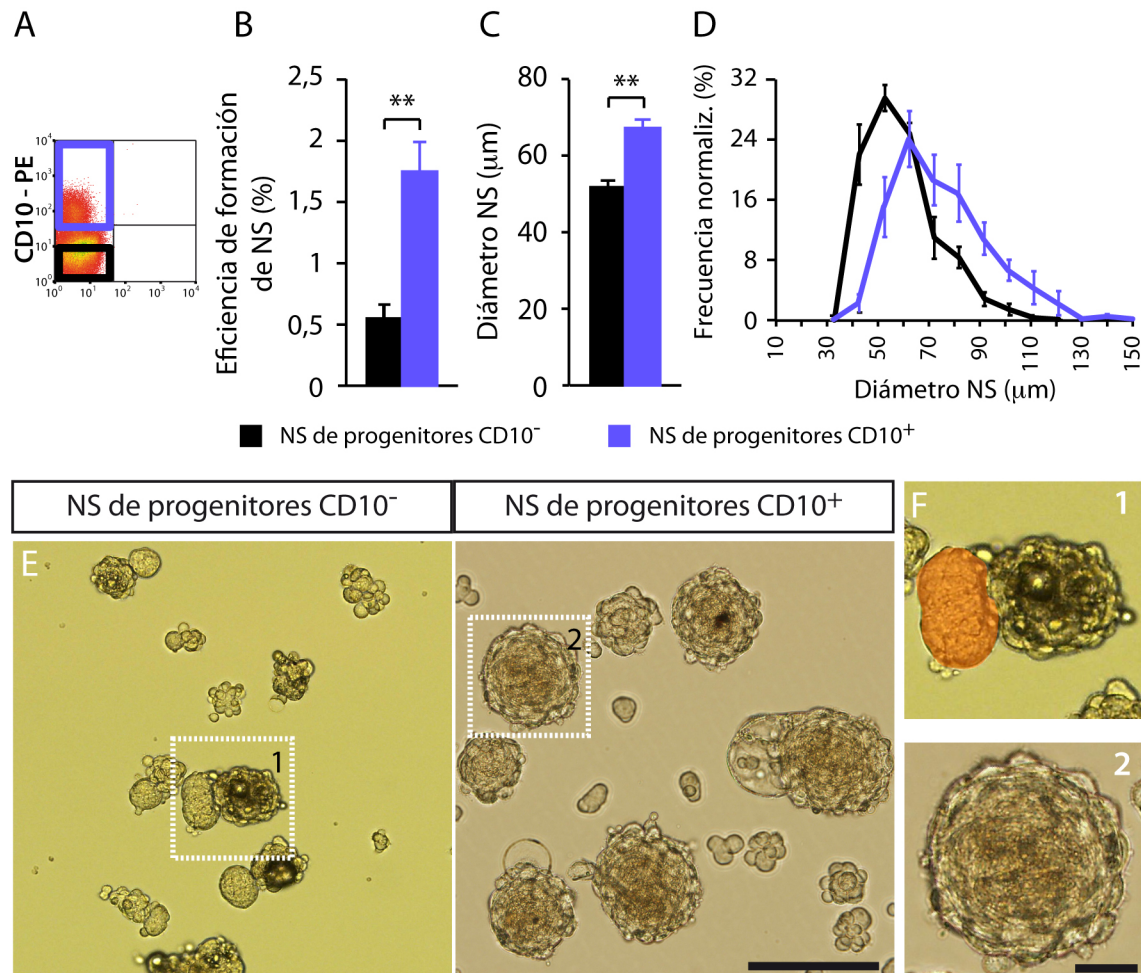


Figura 14. Caracterización de progenitores $CD10^+$. A, Dot-plot representativo que muestra las poblaciones $CD10^-$ y $CD10^+$ separadas por citometría de flujo. B, Eficiencia de formación de NS de las células $CD10^-$ y $CD10^+$. C, Diámetro medio de las NS de células $CD10^-$ y $CD10^+$. D, Histograma normalizado de los diámetros de las NS cuantificados en (C). E, Imágenes de campo claro de NS formadas a partir de células $CD10^-$ y $CD10^+$. Véase que sólo las NS de células $CD10^-$ presentan *blebs*. F, Áreas ampliadas de los recuadros 1 y 2 de (E), que muestran dos ejemplos típicos de NS (*bleb* pseudocoloreado en rojo). Escalas, 200 μm en (E), y 50 μm en (F). ** $p \leq 0,01$. Las barras de error indican el error estándar de la media. Test T de Student.

La alta eficiencia de formación de NS observada en las células $CD10^+$ indica que esta población contiene una subpoblación de progenitores. El aumento estadísticamente significativo del diámetro de las NS procedentes de progenitores $CD10^+$ apunta a que estos progenitores poseen una elevada capacidad proliferativa. La ausencia de *blebs* en estas NS sugiere que estos progenitores $CD10^+$ han perdido la capacidad para

diferenciarse hacia células neuronales TH⁺, aunque este último aspecto ha sido estudiado con más detalle y será expuesto a continuación.

2. Diferenciación de los progenitores CD10⁺

Tras analizar la presencia de progenitores CD10⁺ procedimos a estudiar la multipotencia de estos progenitores. La Figura 15 muestra el estudio del grado y el tipo de diferenciación (neuronal o mesectodérmica) de los progenitores CD10⁺. Como hemos descrito anteriormente, los progenitores de cuerpo carotídeo tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse *in vitro* e *in vivo* hacia células dopaminérgicas positivas para la tirosina hidroxilasa (TH), pero también hacia células de músculo liso (SMA positivas) (Pardal et al., 2007), o hacia células endoteliales (positivas para GSA I) (Annese et al., en revisión).

La figura 15A muestra imágenes de inmunohistoquímica de secciones de NS con anticuerpos frente a tirosina hidroxilasa y Nestina. Se cuantificaron las células positivas para TH en las NS de células CD10⁻ y CD10⁺ (Figura 15C), y se vio que el porcentaje de células dopaminérgicas TH⁺ presentes en las NS de células CD10⁺ (0,95±0,86%) es significativamente menor al porcentaje presente en las NS de células CD10⁻ (38,36±9,92%; p≤0,05). Este resultado confirma la observación inicial que se había hecho en las imágenes de campo claro (Figura 14E-F), e indica que los progenitores CD10⁺ no tienen capacidad de diferenciarse hacia células de tipo neuronal. Tras confirmar la ausencia de diferenciación neuronal en los progenitores CD10⁺, se comprobó la capacidad de diferenciación de estos progenitores hacia el linaje mesectodérmico. La figura 15B muestra imágenes de inmunocitoquímica, con anticuerpos frente a α-SMA y GSA I (lectina), en células de NS cultivadas en sustrato adherente. La cuantificación de las células positivas para cada marcador, y para ambos juntos (α-SMA⁺ GSA I⁺), mostró que los progenitores CD10⁺ tienen capacidad de diferenciarse hacia células de músculo liso, y hacia células endoteliales (Figura 15D-F). En la figura 15D podemos ver que existe una diferencia no significativa en el porcentaje de células GSA I⁺ presente en ambos tipos de NS, siendo este porcentaje superior en las obtenidas a partir de progenitores CD10⁺. Por ello, concluimos que los progenitores

tanto CD10⁻ como CD10⁺ tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia el linaje mesectodérmico, aunque sólo los CD10⁻ lo hacen hacia el linaje neuronal. Puede que los progenitores CD10⁺ posean una capacidad incrementada de diferenciación mesectodérmica, aunque este aspecto no se refleje en los resultados quizás debido a que el sustrato adherente constituye un fuerte estímulo para este tipo de diferenciación, lo que enmascararía una posible diferencia entre las células positivas y negativas para CD10.

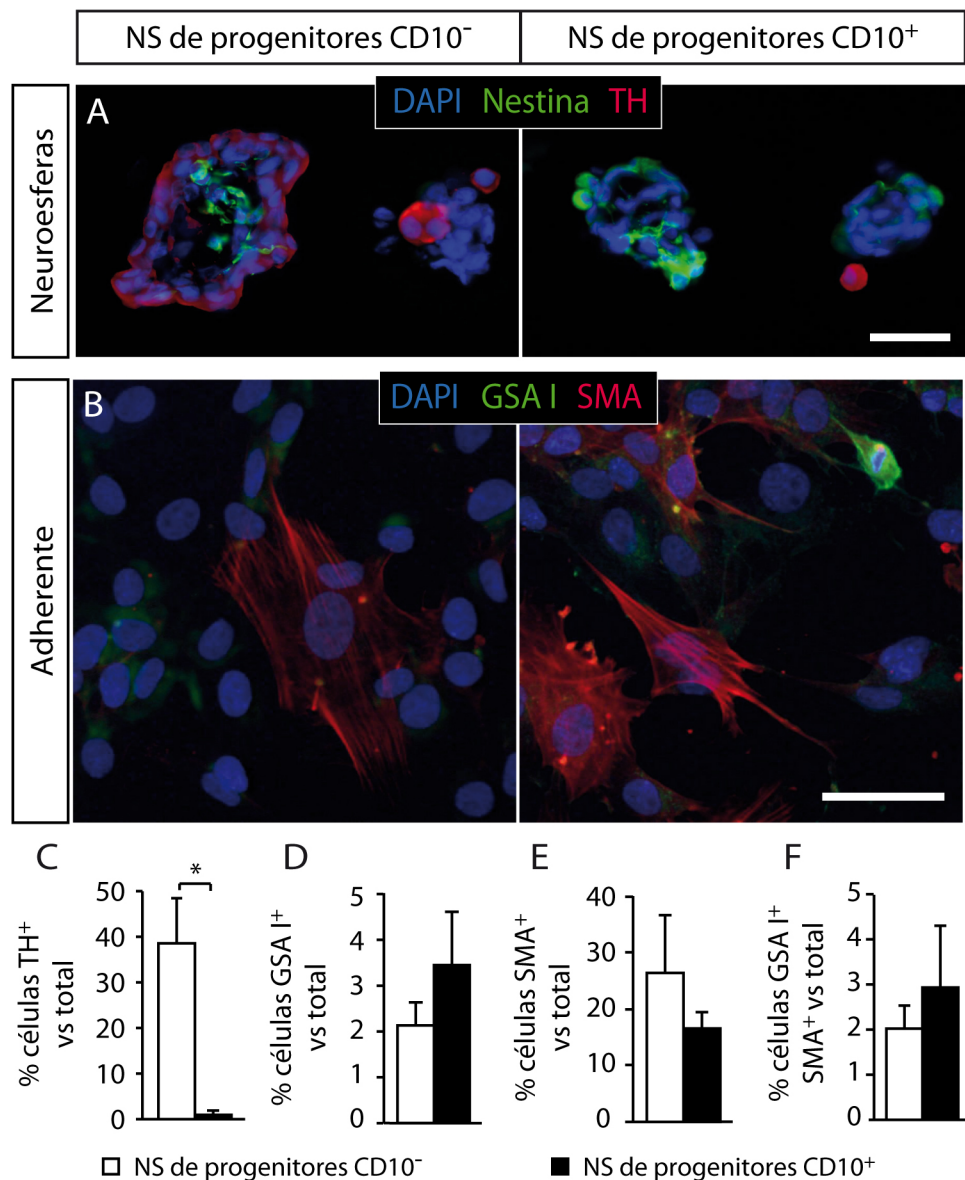


Figura 15. Análisis de diferenciación de progenitores CD10⁺. **A**, Inmunohistoquímica de secciones de NS marcadas con anticuerpos frente a Nestina (verde) y TH (rojo). **B**, Imagen de inmunocitoquímica de NS sembradas en sustrato adherente (fibronectina 5 µg/ml) durante 12 h, marcadas con GSA I (verde) y anticuerpo frente a SMA (rojo). **C**, Cuantificación de células TH⁺ detectadas mediante inmunohistoquímica en NS de progenitores CD10⁻ y CD10⁺ mostradas en (A). **D-F**, Cuantificación de células positivas para GSA I (D), SMA (E) y dobles SMA⁺ GSA I⁺ (F) en NS de células CD10⁻ y CD10⁺ mostradas en (B). Escalas, 30 µm en (A) y 50 µm en (B). * p ≤ 0,05. Test T de Student.

En resumen, el análisis de diferenciación nos indica que los progenitores CD10⁺ no son multipotentes, sino que están restringidos o especificados hacia el linaje mesectodérmico de las células madre del cuerpo carotídeo.

3. Línea primaria de cuerpo carotídeo CBA, enriquecida en células CD10⁺.

El número aproximado de células que posee un CB de rata adulta es de 30.000-60.000, y esta cantidad normalmente resulta insuficiente para llevar a cabo determinadas técnicas de biología molecular y celular como el *Western-Blot*, o la transfección de siRNAs. Al estar el presente trabajo de tesis doctoral centrado en el estudio de lo que parecen ser progenitores restringidos de linaje mesectodérmico, y ser este un linaje con apetencia por el sustrato adherente, se nos ocurrió que podríamos amplificar el número de células progenitoras mesectodérmicas mediante el cultivo adherente de células del CB. Para conseguir esta amplificación se cultivaron células dispersas de CB en medio completo, 21% de O₂ (ver Apartado 3.4 de Materiales y Métodos), y sobre un sustrato tratado para la adherencia celular. Estas células se mantuvieron durante varios días a modo de línea celular, a la que se denominó “línea CBA” (del inglés *Carotid Body Adherent*) (Figura 16).

Los paneles A-A’’ de la Figura 16 muestran imágenes de campo claro del cultivo celular de la línea CBA a distintos tiempos. Tras 3 días *in vitro* (3DIV), las células de CB disperso que se adhieren a la placa comienzan a dividirse (Figura 16A). Estas observaciones indican que hay unidades formadoras de colonias adherentes entre las células de CB. Probablemente estas células incluyan a los progenitores mesectodérmicos, que al cultivarse en sustrato adherente, se adhieren y proliferan. Transcurridos de 7-10 días *in vitro*, las células llegan a confluencia, ocupando toda la superficie del frasco (Figura 16A’’). Dependiendo del número de células sembrado inicialmente, que osciló entre 60.000 y 100.000 células/frasco, la línea tardó entre 7 y 10 días en llegar a confluencia, aunque tras ese tiempo el número de células podía seguir aumentando. Por tanto, a partir de los dos cuerpos carotídeos de un único animal se puede establecer una línea celular adherente, que nos permite incrementar el número de células con fenotipo mesectodérmico exponencialmente.

Para caracterizar esta línea de CB se analizaron las células mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo (Figura 16B-F). La figura 16B muestra imágenes de inmunocitoquímica donde puede observarse que la mayoría de las células de la línea son positivas para CD10, y más de un 25% para Nestina. A continuación, se llevó a cabo una cuantificación detallada de la expresión, por citometría de flujo, de distintos marcadores en estas células de la línea CBA (Figura 16C). En primer lugar, se corroboró que la mayoría de las células son positivas para CD10 ($82,50 \pm 2,37\%$). También se estudió la proporción de progenitores que había en el cultivo adherente, utilizando para ello el marcador Nestina. Un $26,83 \pm 6,03\%$ de las células resultaron ser Nestina⁺. Para ver si las condiciones del cultivo adherente permitían la supervivencia de células neuronales, se analizaron también las poblaciones positivas para TH y para HNK-1, también llamado CD56, que ha descrito en nuestro grupo como marcador de una subpoblación de células neuronales. Los porcentajes obtenidos ($0,2\%$ de células TH⁺ y $0,87 \pm 0,07\%$ de células HNK⁺) fueron discretos, señalando la práctica ausencia de células neuronales en este tipo de cultivos. Asimismo, se comprobó si las células de la línea CBA se estaban diferenciando hacia endotelio, para lo que se utilizó CD31 como marcador de endotelio maduro. Únicamente el $1,85 \pm 0,75\%$ de las células expresaba CD31, por lo que la presencia de células endoteliales maduras es también bastante discreta. Para estudiar cómo variaba el fenotipo de la línea adherente con el tiempo en cultivo, se analizaron las células durante los tres primeros pases mediante citometría de flujo. En la figura 16D-F podemos ver la cuantificación de las poblaciones CD10⁺, Nestina⁺ y HNK⁺ a lo largo de los tres primeros pases. Todas ellas se mantienen en proporciones similares durante los tres primeros pases. Sólo se produce un cambio significativo en el porcentaje de células Nestina⁺ del primer al segundo pase (Figura 16E), aunque vuelve a ser no significativo en el siguiente pase.

Por otro lado, decidimos estudiar la capacidad de formación de NS de las células de la línea adherente, de nuevo durante los tres primeros pases. La figura 16G muestra una típica imagen de campo claro de NS formadas a partir de células de la línea adherente. Estos resultados indican que, al menos durante los tres primeros pases, en la línea CBA persisten células con capacidad de formar NS (Figura 16G-H). La figura 16H muestra la eficiencia de formación de NS de dichas células, la cual se mantiene sin cambios significativos durante estos tres primeros pases. Este resultado de la eficiencia indica que la proporción de progenitores parece mantenerse constante, pese a las

pequeñas variaciones que puedan observarse en la expresión de Nestina. Aunque al comparar el porcentaje de expresión de Nestina con la eficiencia de formación de NS se puede concluir que el marcador Nestina no es ni mucho menos específico de progenitores neurales formadores de esferas. El diámetro medio de las NS también se mantiene constante (Figura 16I). La mayoría de las NS formadas a partir de progenitores de la línea CBA están desprovistas de *blebs* (Figura 16G), al igual que ocurría con las NS formadas a partir de células CD10⁺ de CB disperso. Tomando en conjunto todos estos resultados, podemos concluir que el cultivo de células de CB en sustrato adherente favorece un enriquecimiento en el linaje mesectodérmico, incluyendo la presencia de una población de progenitores, restringidos para este linaje, y capaces de formar NS *in vitro*.

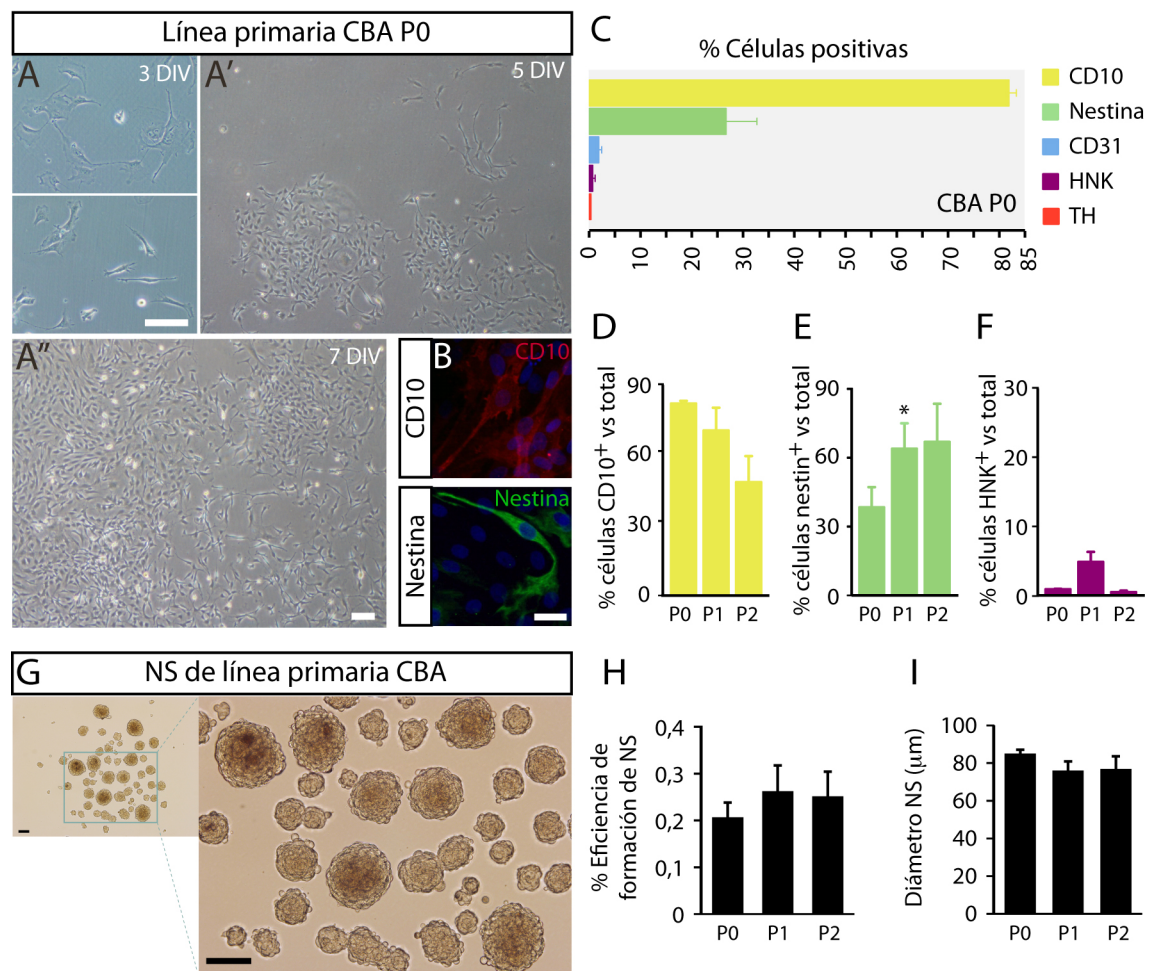


Figura 16. Caracterización de la línea adherente CBA. A-A'', Imágenes de campo claro de células de la línea CBA, cultivada durante 3 (A); 5 (A') y 7 DIV (A''). B, Imágenes de inmunocitoquímica frente a CD10 (arriba, rojo) y Nestina (abajo, verde) en células de la línea CBA (de 10 DIV). C, Caracterización de la línea primaria CBA en pase inicial mediante citometría de flujo, se muestra la cuantificación de células CD10⁺, Nestina⁺, CD31⁺, HNK⁺ y TH⁺. D-F, Cuantificación de células CD10⁺ (D), nestina⁺ (E) y HNK⁺ (F) en los tres primeros pases. G, Imágenes de campo claro de NS formadas a partir de células de la línea CBA. H, Eficiencia de formación de NS de los progenitores presentes en la línea CBA en los pases 0; 1 y 2. I, Diámetro medio de las NS cuantificadas en (H). Escalas, 50 μm en (A-A''), 30 μm en (B) y 100 μm en (G). * p≤0,05. Test T de Student.

En la Figura 17 hemos querido mostrar una comparación entre las NS obtenidas a partir de células dispersas del CB, NS obtenidas de la línea CBA, y NS obtenidas de células CD10⁺ aisladas por citometría de flujo a partir de CB disperso. El número de NS formadas a partir de células de la línea primaria es similar al obtenido en el ensayo de NS con células de CB completo (Figura 17D), pero mucho menor al obtenido a partir de células CD10⁺ de CB recién disperso. Las células positivas para CD10 tienen una eficiencia de formación de NS ($1,80 \pm 0,19\%$) seis veces mayor que la de las células de CB disperso ($0,31 \pm 0,03\%$), o que la de células de la línea ($0,21 \pm 0,03\%$ en P0; $0,26 \pm 0,05\%$ en P1; $0,25 \pm 0,05\%$ en P2). Este resultado significa que en la línea CBA hay una alta presencia de células CD10⁺ no progenitoras (parcialmente diferenciadas hacia células mesectodérmicas), lo que provoca que la proporción de células CD10⁺ capaces de formar NS sea menor y muy parecida al caso del tejido *in situ*, pese a la alta expresión de CD10 en las células de la línea. El diámetro medio de las NS obtenidas de la línea adherente, de forma similar a lo que ocurre con las NS obtenidas de células CD10⁺ recién dispersas, es significativamente mayor al diámetro de NS obtenidas a partir de células de CB completo (Figura 17E). Este resultado es coherente con las diferencias observadas en la presencia de *blebs* entre estas NS (Figura 17 A-C), y confirman que el cultivo en adherente está seleccionando progenitores restringidos al linaje mesectodérmico, muy probablemente similares a los progenitores CD10⁺ obtenidos directamente del órgano. En definitiva, la línea celular adherente de CB nos permite aumentar exponencialmente el número de células, y sobre todo es una técnica que favorece un enriquecimiento en el linaje mesectodérmico del CB. El cultivo de la línea adherente CBA podría suponer por tanto un método útil para conseguir mayores biomásas de células mesectodérmicas del CB, con las que llevar a cabo algunas de las técnicas de biología molecular y celular que se han utilizado en este trabajo de tesis doctoral.

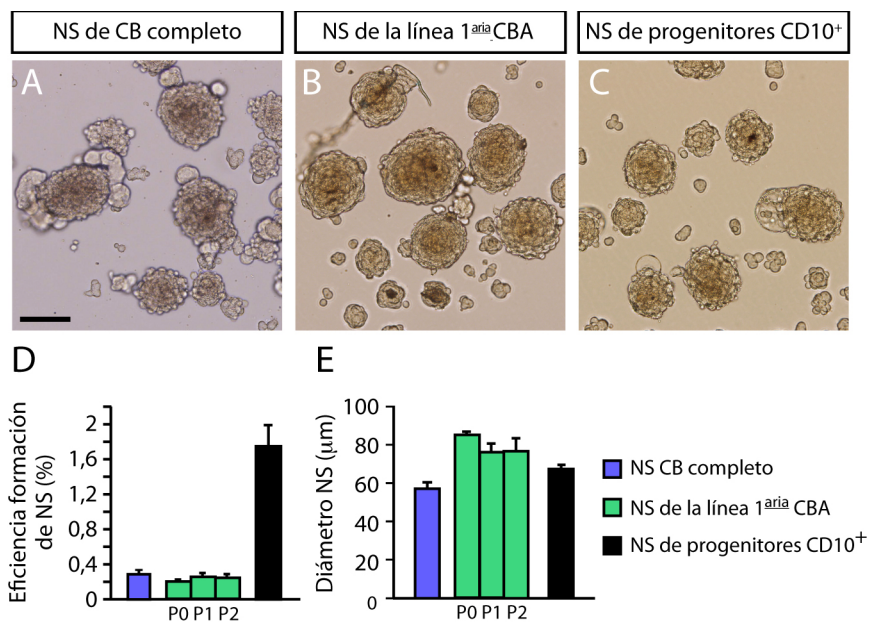


Figura 17. Comparación entre las neuroesferas obtenidas de células dispersas de CB, NS de células de la línea adherente CBA, y NS de células CD10⁺ separadas por citometría de flujo. A-C, Imágenes representativas de campo claro de las diferentes NS: NS formadas a partir de células de CB disperso (A), NS de células de la línea celular CBA (B), y NS a formadas a partir de células CD10⁺ separadas por citometría de flujo (C). **D,** Eficiencia de formación de los distintos tipos de NS mostradas en (A, B y C). **E,** Diámetro medio de cada uno de los tipos de NS cuantificadas en (D). Escala, 100 μm.

C. Los progenitores CD10⁺ se activan ante un estímulo hipóxico

Los datos presentados hasta el momento, sobre el análisis de co-expresión y el estudio de los progenitores CD10⁺, muestran que CD10 marca una población de células del linaje mesectodérmico del CB. A continuación, quisimos investigar qué función tenía la proteína CD10 en este nicho, y por tanto qué papel están jugando las células positivas para este marcador. CD10 es una endopeptidasa de membrana con dos mecanismos de acción, llevados a cabo por el dominio catalítico y por el dominio intracelular que posee esta proteína (ver figura 7D, en el apartado 5.1 Introducción). El dominio catalítico se encarga de degradar una gran variedad de péptidos extracelulares señalizadores, insensibilizando a las células a estas señales. Esta acción es clave para el mantenimiento del estado de célula madre (“*stemness*” en inglés) en nichos germinales tales como el tejido mamario (Bachelard-Cascales et al., 2010), y está siendo investigada en la actualidad también en otros nichos. En paralelo a esta actividad enzimática, el dominio intracelular de la proteína CD10 interviene en procesos de señalización a través de la interacción con PTEN, que media diversos procesos celulares, tales como proliferación, migración, diferenciación endotelial o angiogénesis (Maguer-Satta et al., 2011a).

Para examinar el papel de la proteína CD10 presente en los progenitores CD10⁺, se anuló su actividad endopeptidasa, o se disminuyó la expresión de la proteína completa mediante siRNAs. La supresión de la actividad enzimática se realizó mediante el inhibidor de CD10 Tiorfan (*Thiorphan* o \pm -3-mercapto-2-benzilpropanoilglicina; Figura 18A) (10 μ M, Sigma) (Roques et al., 1980). Éste es un inhibidor selectivo con una alta afinidad por el sitio activo de CD10, concretamente por el átomo de zinc que contiene esta proteína (David et al., 1999). La figura 18B muestra un diagrama de la unión de Tiorfan al sitio activo de neprilisina, una posición en la que impide que los sustratos se unan al sitio activo y sean degradados. Como consecuencia de esta inhibición, la concentración extracelular de los sustratos de CD10 aumenta, y como resultado sus efectos sobre las células serán mayores.

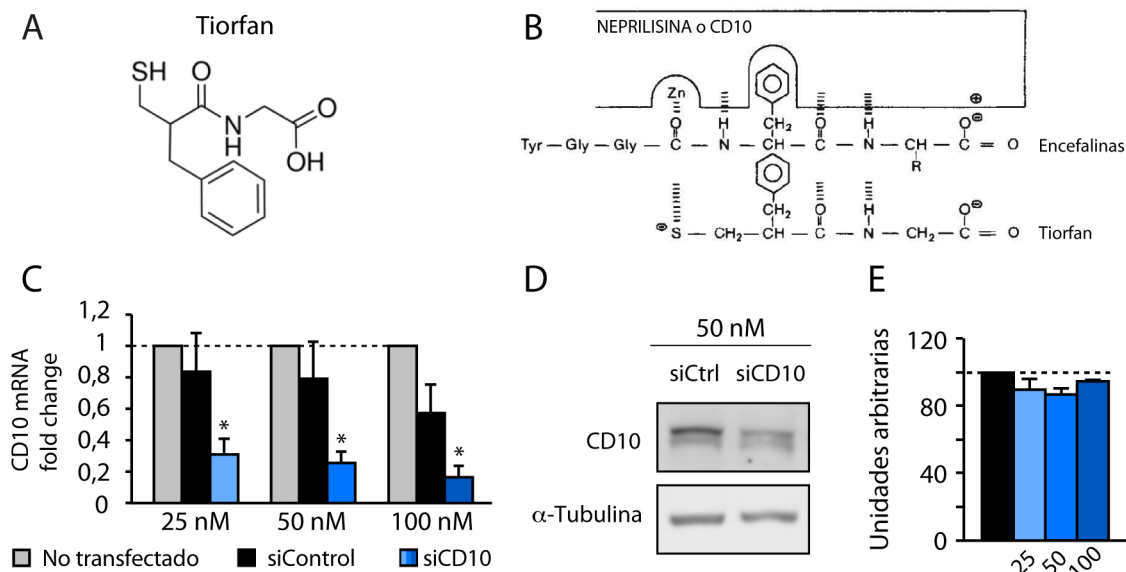


Figura 18. Puesta a punto de la inhibición farmacológica y genética de CD10. **A**, Estructura molecular de Tiorfan. **B**, Modelo de unión de Tiorfan al sitio activo de CD10. **C**, Curva dosis respuesta de la expresión de CD10, cuantificada mediante qPCR 48h post-transfección con siRNAs a distintas concentraciones. Se seleccionó 50nM porque provocó la bajada de expresión más significativa afectando lo mínimo a las células. **D**, Western-blot de CD10 de las muestras transfectadas con siRNAs Control y CD10 (50nM). La α -Tubulina ha sido utilizada como control de carga. **E**, Cuantificaciones densitométricas de la proteína CD10 en presencia de siCD10 a distintas concentraciones. ST: Sin transfectar. * $p \leq 0,05$. Test T de Student.

Asimismo se examinó el papel de CD10 mediante silenciamiento génico; disminuyendo la expresión de la proteína mediante la interferencia de la traducción de su mRNA. Estos ensayos se realizaron mediante transfección de oligonucleótidos de siRNA específicos para el gen *Mme* de rata. Para el diseño de los siRNAs se utilizaron secuencias que habían sido testadas anteriormente (Tong et al., 2008). Con este método de supresión se verán reducidos ambos mecanismos de acción de la proteína CD10, el catalítico externo y el de señalización interna. Antes de llevar a cabo el experimento de silenciamiento génico, se realizó una curva dosis-respuesta con tres concentraciones crecientes de siRNAs (25, 50, y 100nM). Se utilizó como control una mezcla de 4 oligonucleótidos de siRNA diseñados y testados para obtener la mínima interacción con el mRNA de rata, por lo que sólo causarían daños celulares propios de la transfección, debidos en parte a la Lipofectamina (Invitrogen). En la figura 18C se muestra un gráfico que representa los cambios (*fold change*) en la expresión de CD10, 48 horas después de la transfección con las diferentes concentraciones de siRNAs. De las tres concentraciones probadas, se seleccionó 50nM, ya que era la que más disminuía la expresión del gen CD10 sin provocar daños significativos por parte de los siRNAs

control. Utilizando las secuencias de siCD10 a 100nM disminuye la expresión significativamente (Figura 18C), pero la transfección de siControl a 100nM también disminuye la expresión, lo que significa que la disminución observada con siCD10 podría ser no específica. También se comprobaron los niveles de proteína en las muestras transfectadas con siRNAs de CD10 mediante *Western-Blot*. En la figura 18D podemos observar la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína CD10 que provoca la transfección con siCD10 a 50nM. Aunque ninguna de las concentraciones de siRNA provocó un cambio estadísticamente significativo a nivel de proteína, la disminución más acusada se produjo con la concentración de 50nM (Figura 18E).

1. CD10 controla la proliferación de los progenitores CD10⁺

En primer lugar, en el estudio funcional del papel de CD10 se analizó la proliferación de los progenitores CD10⁺, para lo cual se estudió la eficiencia de formación de NS y el diámetro de las mismas. La Figura 19 muestra las diferencias entre los progenitores tratados con el inhibidor Tiorfan (10μM) y los no tratados, o entre los progenitores transfectados con siCD10 y los transfectados con siControl. En ambos casos se observa un aumento estadísticamente significativo en la eficiencia de formación de NS formadas a partir de células CD10⁺ (Figuras 19B y 19G). Estos resultados sugieren que una de las funciones de CD10 sería mantener a los progenitores mesectodérmicos en estado de reposo, probablemente insensibilizándolos frente a péptidos mitogénicos presentes en el medio, tales como FGF-2 o ET-1. Esta función de CD10 ha sido descrita en otros tejidos del organismo (Goodman et al., 2006; Karoor et al., 2013). La inhibición por tanto de la actividad catalítica externa de CD10, ya sea mediante Tiorfan o con siRNAs, evita que CD10 degrade péptidos pro-proliferativos, por lo que las células se sensibilizan y proliferan más, dando lugar a más neuroesferas. Por otro lado, los progenitores CD10⁻ no ven modificada ni su eficiencia de formación de NS ni el diámetro de las NS que generan tras la aplicación de Tiorfan (Figura 19B-C). Este hecho muestra la especificidad del inhibidor utilizado, que parece afectar únicamente a los progenitores CD10⁺.

La figura 19C muestra la cuantificación del diámetro medio de las NS obtenidas a partir de células CD10⁻ y CD10⁺ tratadas o no con Tiorfan, y puede observarse que no

hay diferencias significativas. Sin embargo, en la figura 19H vemos que el silenciamiento de CD10 mediante siRNAs sí redujo significativamente el diámetro de las NS de células CD10⁺. En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de la actividad catalítica externa de CD10 no afecta a la proliferación una vez iniciada, ya que puede seguir ocurriendo señalización interna. Sin embargo, al disminuir los niveles de expresión de la proteína completa, sigue activándose más la proliferación (mayor eficiencia de formación de NS), pero en este caso con menor tasa proliferativa (menor diámetro de NS).

El dominio citoplasmático de CD10 interviene en múltiples procesos por medio de su interacción directa proteína-proteína con: la subunidad p85 de la kinasa fosfatidil inositol 3 (PI3K), la kinasa Lyn, las proteínas del grupo ERM (Ezrina, Radixina, Moesina), y la proteína PTEN. Esta última es una fosfatasa que antagoniza la actividad de la PI3K a través de la desfosforilación de PIP₃ a PIP₂, actuando como regulador negativo de la ruta de señalización PI3K/Akt (Cantley y Neel, 1999; Sumitomo et al., 2005). Cuando CD10 se expresa, la proteína CD10 secuestra en su dominio citoplasmático a PTEN estabilizándolo, como consecuencia, aumentan los niveles de PTEN y de su actividad fosfatasa en la célula. El silenciamiento génico que hemos aplicado en este estudio funcional hace que CD10 desaparezca, y por tanto se pierda la capacidad de estabilizar a PTEN. Debido a esto, caen los niveles de PTEN y éste no inactiva la ruta PI3K/Akt, implicada en la proliferación celular (Sumitomo et al., 2005). Creemos que esta señalización interna está presente si anulamos únicamente la actividad enzimática externa de CD10 en los progenitores CD10⁺ de CB, lo que explicaría la ausencia de cambios en el diámetro de las NS en estas células (Figura 19C). Nuestros resultados sugieren que en el cuerpo carotídeo la señalización interna asociada a CD10, probablemente a través de PTEN, es necesaria para regular la proliferación de los progenitores CD10⁺ una vez activados, al igual que ocurre en algunos casos de células tumorales (Maguer-Satta et al., 2011a; Sumitomo et al., 2005). En cualquier caso, parece claro que CD10 está jugando un papel relevante en la activación proliferativa de estos progenitores mesectodérmicos del CB.

2. CD10 controla la diferenciación mesectodérmica de los progenitores CD10⁺

A continuación evaluamos el papel de CD10 en la diferenciación mesectodérmica, concretamente endotelial, de las CBSCs. CD10 ha sido descrito como un regulador clave de la diferenciación endotelial y la angiogénesis en diversos tejidos, como en las células tumorales del epitelio de próstata (Goodman et al., 2006; Mitra et al., 2013). En nuestro caso, quisimos comprobar si CD10 jugaba un papel en la regulación de la angiogénesis en el CB.

La figura 19D e I muestra imágenes de inmunocitoquímica de células de NS cultivadas en sustrato adherente para permitir la diferenciación mesectodérmica de las CBSCs. La cuantificación de las células endoteliales (GSA I⁺) mostrada en la figura 19E indica que hay un aumento significativo del número de estas células cuando aplicamos Tiorfan a los progenitores CD10⁺. Estos resultados se confirmaron mediante el silenciamiento génico con siRNAs, un método con el que de nuevo se obtuvo un aumento significativo del número de células endoteliales en la condición de silenciamiento del gen CD10 (Figura 19J). Por tanto, la diferenciación mesectodérmica de los progenitores CD10⁺ hacia células endoteliales (GSA I⁺ o lectina⁺) está favorecida por la inhibición farmacológica o genética de CD10 (Figura 19). De nuevo, la adición de Tiorfan no afecta a la diferenciación endotelial de los progenitores CD10⁻ (Figura 19E), reafirmando la especificidad de la droga y del efecto observado.

En conjunto, los resultados sobre proliferación y diferenciación de las CBSCs, indican que CD10 está marcando unos progenitores mesectodérmicos que se encuentran en reposo durante la normoxia. Estos progenitores están restringidos a formar parte del tejido vascular del CB, pero tienen retenida su diferenciación hacia este linaje a través del control que ejerce la proteína CD10.

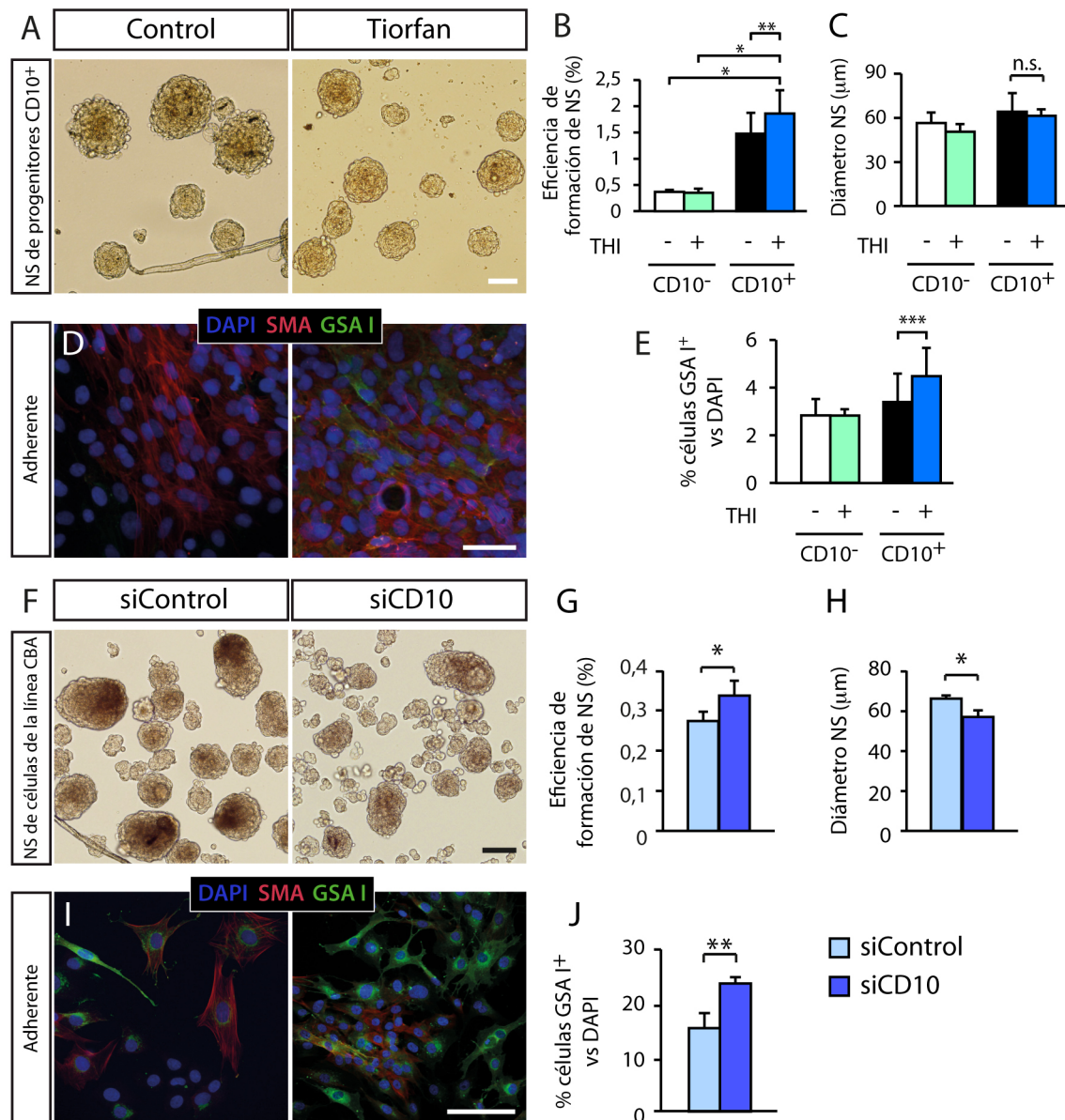


Figura 19. Papel funcional de CD10 en las células madre del CB. **A**, Imágenes de campo claro de NS obtenidas a partir de células CD10⁻ y CD10⁺ separadas por citometría de flujo, y tratadas o no con Tiorfan (THI; 10 μM). **B**, Eficiencia de formación de NS de las células CD10⁻ y CD10⁺ cultivadas con o sin THI. **C**, Diámetro medio de las NS formadas a partir de células CD10⁻ y CD10⁺ tratadas o no con THI. **D**, Inmunocitoquímica representativa de progenitores obtenidos a partir de NS CD10⁻ y CD10⁺, cultivadas con o sin Tiorfan. Las células fueron marcadas con lectina (GSA I; verde) y con anticuerpo anti-SMA (rojo) para detectar las células diferenciadas hacia endotelio o hacia músculo liso respectivamente. **E**, Cuantificación de células GSA I⁺ obtenidas en los experimentos mostrados en (D). No se observaron cambios significativos entre las células SMA⁺. **F**, Imágenes representativas de campo claro de NS obtenidas de células de la línea adherente CBA, transfectadas con siRNAs Control o CD10 (siControl, siCD10; 50nM). **G**, Eficiencia de formación de las NS mostradas en (F). **H**, Diámetro medio de las NS cuantificadas en (G). **I**, Imagen representativa de inmunocitoquímica realizada en progenitores de las NS mostradas en (F), que fueron sembradas en sustrato adherente. Las células fueron marcadas con lectina (verde) y anti-SMA (rojo). **J**, Cuantificación de células GSA I⁺ obtenidas en las inmunocitoquímicas mostradas en (I). Escala, 50 μm. * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001. n.s.: diferencia no significativa. Test T de Student.

3. La expresión de CD10 está regulada por hipoxia en el cuerpo carotídeo

La expresión de CD10 está regulada por la hipoxia en multitud de tipos celulares, tales como neuronas (Fisk et al., 2007; Wang et al., 2011), células de pulmón (Carpenter y Stenmark, 2001), células de próstata (Mitra et al., 2013) o células de cuerpo carotídeo (Grasemann et al., 1999). En periodos relativamente largos de hipoxia, la expresión de CD10 disminuye, pero en algunos tratamientos agudos (de 60-240 minutos) los niveles de mRNA y de proteína CD10 pueden elevarse (Wang et al., 2014). La disminución de CD10 en condiciones de hipoxia prolongada está regulada a nivel transcripcional, a través de la unión de HIF1- α (del inglés *hypoxia inducible factor*) a los elementos de respuesta a hipoxia 2 y 3 (HREs, del inglés *hypoxia responsive elements*) presentes en el promotor de CD10 (Mitra et al., 2013). Este gen actúa como supresor tumoral, y dado que HIF funciona normalmente activando la expresión génica, el caso de CD10 constituye uno de los pocos ejemplos de regulación negativa mediada por HIF durante la hipoxia. El uso de inhibidores farmacológicos como Tiorfan ha permitido determinar que CD10 juega un papel esencial en la respuesta hipóxica del CB (Kumar et al., 1990). La inhibición o la bajada de CD10 a nivel transcripcional produce un aumento de la respuesta hipóxica del órgano (Kumar et al., 2000a), a través de la sensibilización de las células a determinados péptidos, como la sustancia P (SP), aunque los mecanismos concretos a nivel celular y molecular se desconocen.

Los datos obtenidos en este trabajo de tesis doctoral apuntan a que los progenitores CD10⁺ se encuentran en reposo en normoxia, y que una bajada en la función de CD10 provoca proliferación y diferenciación endotelial en estas células. Dado el papel descrito de la hipoxia como regulador negativo de CD10, una hipótesis plausible sería que la hipoxia fuese el estímulo que activara a los progenitores CD10⁺ mediante la inhibición de la función de esta proteína de membrana. De acuerdo con esta hipótesis, la llegada de la hipoxia activaría igualmente la diferenciación de estos progenitores hacia células endoteliales. Decidimos por tanto analizar, durante un estímulo hipóxico, tanto la cantidad de células CD10⁺ presentes en el órgano como el nivel de expresión de CD10 que presentaban estas células.

En primer lugar, varios grupos de ratas fueron sometidos a hipoxia (10% PO₂) durante distintos periodos de tiempo (2, 4, 7 ó 21 días), tras lo cual se sacrificaron y se cuantificó el porcentaje de células CD10⁺ presentes en el CB mediante citometría de

flujo. La figura 20A muestra dos *dot-plots* representativos de las células CD10⁺ presentes en un CB en normoxia y en un CB tras exposición del animal durante 4 días a hipoxia. En la figura 20B se muestra la cuantificación del porcentaje de células CD10⁺ en cada tiempo de exposición a hipoxia. Los resultados muestran que en el CB la población CD10⁺ disminuye un tercio en tratamientos de 2 días de hipoxia, alcanzando a los 21 días una disminución superior al 60% con respecto a las células CD10⁺ que hay en normoxia. El nivel de expresión de CD10 se cuantificó tanto mediante qPCR (Figura 20C), como mediante FACS (Figura 20D). Ambos gráficos muestran un claro descenso en el nivel de expresión de CD10 cuando el animal está sometido a hipoxia. Por último, en la figura 20E vemos un claro incremento de los glóbulos rojos en la sangre de las ratas expuestas a hipoxia, lo que corrobora que el estímulo hipóxico se está aplicando correctamente.

Para corroborar el efecto de la hipoxia sobre la expresión de CD10 se llevaron a cabo también experimentos *in vitro*. Se analizaron los niveles de CD10 en neuroesferas de CB expuestas a hipoxia (3% O₂). La figura 20F muestra dos *dot-plots* con la población CD10⁺ presente en NS cultivadas en normoxia y en hipoxia. Las cuantificaciones de esta población de células CD10⁺ aparecen en la figura 20G, y en ella vemos un aumento significativo en el porcentaje de células CD10⁺ en las NS cultivadas en hipoxia. Se cuantificó mediante FACS igualmente la expresión de CD10 en las células CD10⁺, y se comprobó que el nivel de expresión disminuye significativamente en hipoxia (Figura 20H). Este dato fue confirmado por qPCR, que de nuevo mostró una disminución significativa de los niveles de mRNA de CD10 en las NS hipóxicas (Figura 20I). Se utilizaron los genes GLUT1 y VEGF para comprobar que el estímulo hipóxico se estaba aplicando correctamente *in vitro*. El resultado fue que efectivamente, ambos genes de respuesta a hipoxia aumentan su expresión en las NS expuestas al estímulo de bajo oxígeno (Figura 20J-K). En conjunto, estos resultados indican que la expresión de CD10 en hipoxia también decrece *in vitro*, pese al aumento significativo de células CD10⁺ en las neuroesferas hipóxicas, lo cual puede ser debido a una rápida diferenciación mesectodérmica en el interior de la NS. Por tanto, podemos concluir que en el CB, la hipoxia crónica disminuye la cantidad de células CD10⁺ *in vivo*, así como el nivel de expresión de la proteína tanto *in vivo* como *in vitro*.

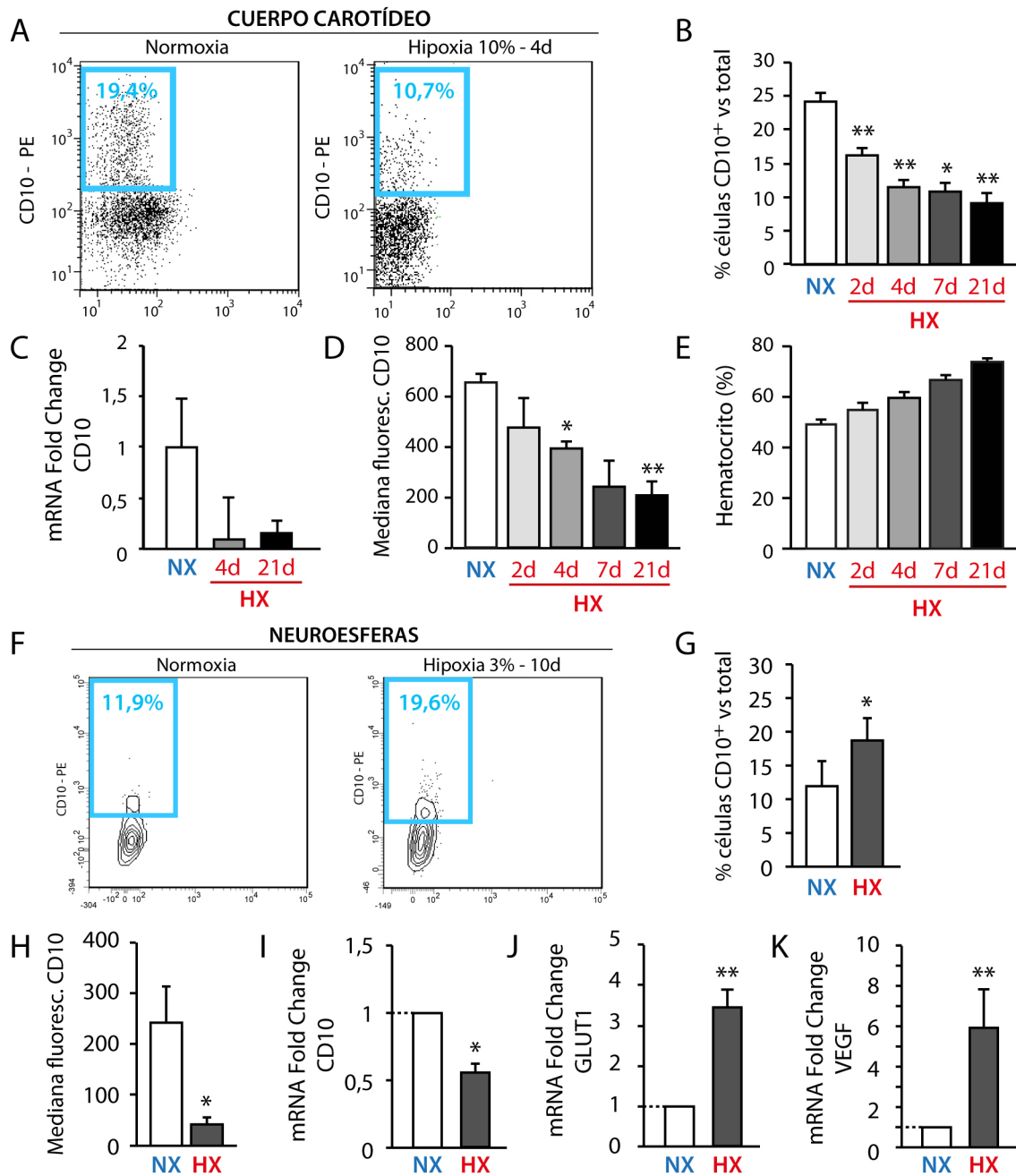


Figura 20. Regulación de CD10 en hipoxia. **A**, Dot-plots representativos de células de CB de rata normóxica (NX, izquierda), y de rata expuesta a hipoxia durante 4 d (HX, derecha). **B**, Cuantificación del porcentaje de células CD10⁺ en NX e HX (durante 2; 4; 7 y 21 d) analizado mediante citometría de flujo. Se observa una disminución estadísticamente significativa en todos los puntos temporales, siendo más acusada la bajada tras 21 d de exposición a hipoxia. **C**, Niveles de expresión de CD10, cuantificados por qPCR, en CB de ratas normóxicas y expuestas a HX durante 4 y 21 d. **D**, Mediana de la intensidad de fluorescencia de las células CD10⁺ en cada condición. Esta medida indica el nivel de expresión de CD10 en las células CD10⁺. Se observa una bajada en la expresión de CD10, tanto por qPCR como por FACS. **E**, Porcentaje de glóbulos rojos medido mediante hematocrito en sangre de ratas expuestas a HX, el cual muestra que los animales fueron expuestos a hipoxia correctamente. **F**, Dot-plots representativos de células de NS cultivadas en NX (izq.) e HX (3% PO₂, der.). **G**, Cuantificación del porcentaje de células CD10⁺ en NX e HX, analizadas mediante FACS. **H**, Mediana de la intensidad de fluorescencia de las células CD10⁺ en cada condición. **I**, Nivel de expresión de CD10 medido por qPCR, en NS cultivadas en NX e HX. Al igual que ocurre *in vivo*, en NS también se observa una bajada significativa del nivel de expresión de CD10. **J-K**, Niveles de expresión de GLUT1 (J) y VEGF (K) en NS cultivadas en NX e HX. * p≤0,05; ** p≤0,01. Test T de Student.

La exposición del CB a hipoxia durante 2 días aún no provoca el característico aumento del tamaño del órgano que se observa posteriormente (Pardal et al., 2007). Sin embargo, tras sólo dos días ya se observa una bajada significativa del número de células CD10⁺ *in vivo*. Nuestros resultados sugieren que esta disminución de la expresión de CD10 en los progenitores mesectodérmicos, que se encuentran en estado latente en condiciones de normoxia, podría sensibilizarlos a citoquinas presentes en el nicho, provocar su activación proliferativa, y finalmente su maduración hacia células vasculares, contribuyendo así a la angiogénesis que ocurre en el órgano durante un estímulo hipóxico mantenido. Esta progresión del linaje mesectodérmico en el CB requiere de una comunicación estrecha entre las células vasculares y los progenitores del CB, posiblemente a través de la liberación de péptidos señalizadores durante el estímulo hipóxico. Uno de los péptidos candidato para esta comunicación es la endotelina-1 (ET-1), liberada por las células vasculares en los nichos neurogénicos del sistema nervioso (Pardal y Platero-Luengo, 2011; Ramírez-Castillejo et al., 2006; Shen et al., 2008), y también por las células glómicas en el caso del CB (Platero-Luengo, 2014b; Platero-Luengo et al., 2014a). Dado que la ET-1 es uno de los principales sustratos de CD10, se estudió a continuación si esta citoquina tenía un papel en la activación de los progenitores CD10⁺ del CB durante la hipoxia.

D. CD10 como mediador del efecto de la endotelina-1 en los progenitores de CB

1. La ET-1 provoca un aumento en la proporción de células CD10⁺

La endotelina-1 es un péptido pro-angiogénico liberado durante la hipoxia en el nicho del CB (Chen et al., 2007a; Platero-Luengo et al., 2014a). Además, es uno de los principales sustratos de CD10 (Dempsey et al., 2009; Karoor et al., 2013). En primer lugar, quisimos analizar el efecto que producía la ET-1 en la población CD10⁺ del CB. Se realizaron cultivos de NS, tratadas o no con esta citoquina, y se analizaron mediante FACS y PCR cuantitativa (Figura 21A-D). En la figura 21A podemos ver imágenes de campo claro de las NS tratadas con ET-1 (0,01 μ M), junto a NS no tratadas o NS control. De acuerdo con el papel pro-proliferativo de la ET-1 sobre las CBSCs (Platero-Luengo, 2014b), se obtuvieron más NS y de mayor tamaño al añadir esta citoquina al medio de cultivo. Los resultados del análisis genético mediante qPCR confirmaron que ET-1 aumenta la expresión de CD10 *in vitro* (Figura 21B). A continuación, se comprobó mediante citometría de flujo el porcentaje de células CD10⁺ en las NS tratadas *versus* las NS control (Figura 21C). La cuantificación de estos ensayos se muestra en la figura 21D, en la que vemos un aumento estadísticamente significativo del número de células CD10⁺ en las NS tratadas con ET-1 (26,2 \pm 3,3%) con respecto a las NS control (15,4 \pm 2,7%) ($p < 0,001$). De nuevo en concordancia con el efecto inductor de la ET-1 sobre la proliferación de los progenitores multipotentes del CB (Platero-Luengo et al., 2014a), las NS tratadas con la citoquina daban lugar a un mayor número de NS secundarias tras su disociación y re-siembra (Figura 21E-G).

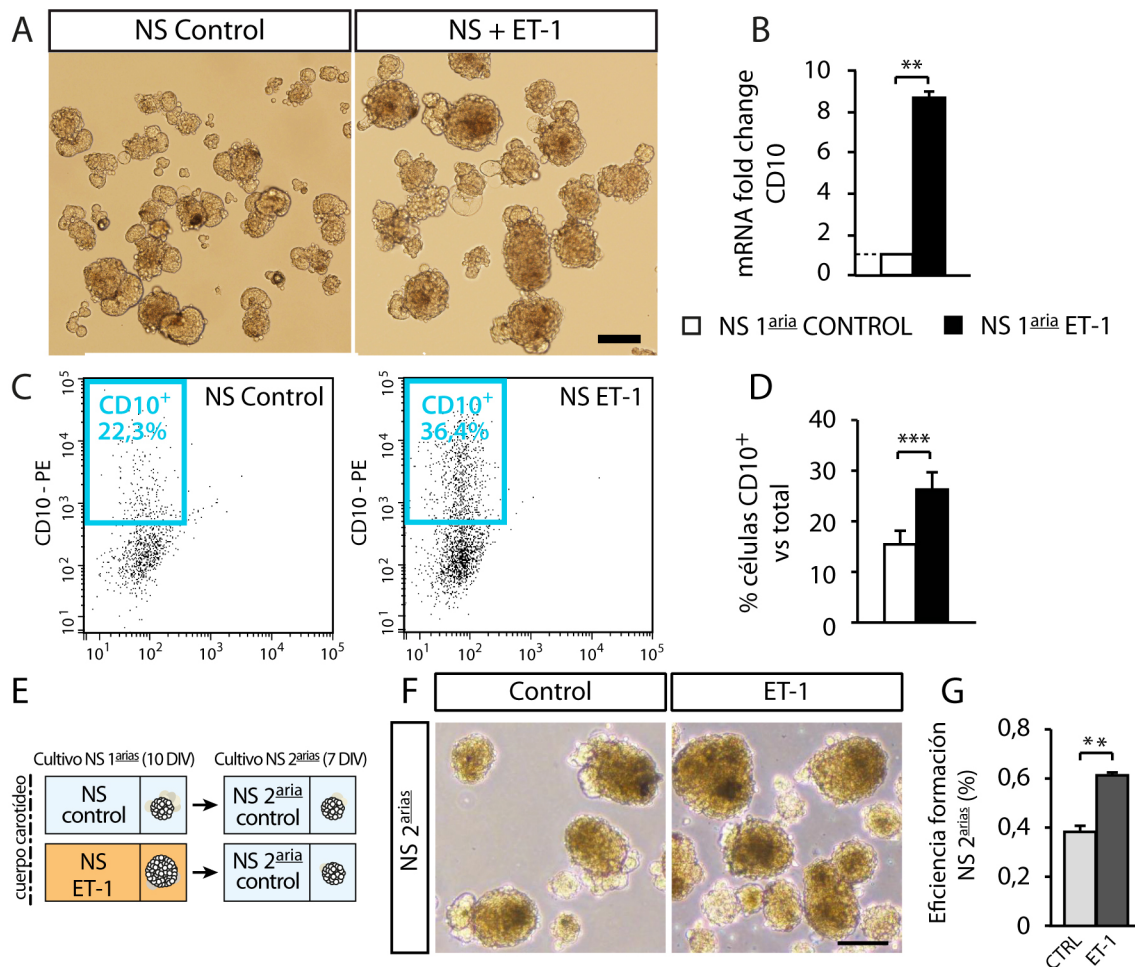


Figura 21. Efecto de la ET-1 en células CD10⁺ del CB. **A**, Imágenes de campo claro representativas de neuroesferas control (sin ET-1; izquierda) y neuroesferas tratadas con ET-1 (derecha). **B**, Niveles de expresión de CD10 obtenidos mediante qPCR en NS control y NS tratadas con ET-1. **C**, *Dot-plots* representativas de células de NS control (izquierda) y NS tratadas con ET-1 (derecha). **D**, Porcentaje de células CD10⁺ cuantificadas mediante FACS. **E**, Esquema explicativo de la realización de los experimentos de neuroesferas secundarias (Control y ET-1). Las NS primarias se cultivaron con o sin ET-1 durante 10 DIV, posteriormente las NS fueron dispersadas y re-sembradas de nuevo en medio completo (ambas NS secundarias sin añadir ET-1), durante 7 DIV. **F**, Imágenes de campo claro representativas de NS secundarias formadas a partir de progenitores de NS primarias control y tratadas con ET-1, obtenidas tal y como se explica en (E). **G**, Cuantificación de la eficiencia de formación de NS secundarias de los progenitores de NS (primarias) control y tratadas con ET-1, mostradas en (F). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Escala, 100 μ m.

2. La ET-1 promueve el linaje mesectodérmico del CB

Adicionalmente a su acción pro-proliferativa sobre las CBSCs (Platero-Luengo et al., 2014a), la ET-1 induce angiogénesis en el CB (Chen et al., 2007a). El aumento observado en los niveles de CD10, un marcador que, como acabamos de exponer, es específico del linaje mesectodérmico del CB, podría ser compatible con que la ET-1

estuviese promoviendo la diferenciación de las CBSCs hacia este linaje. Para corroborar esta hipótesis, analizamos el grado de diferenciación que producía la ET-1 *in vitro*, mediante inmunohistoquímica frente al marcador endotelial lectina (GSA I) y frente a CD10, en secciones de neuroesferas (Figura 22A). La figura 22B muestra la cuantificación del área positiva para GSA I, donde podemos observar que no hay diferencias significativas entre las NS control y las NS tratadas con endotelina. No obstante, la cuantificación del área CD10⁺ en las NS tratadas con ET-1 sí muestra un aumento estadísticamente significativo (Figura 22C), confirmando el aumento de células CD10⁺ observado mediante citometría.

A continuación, analizamos la capacidad de diferenciación de las CBSCs mediante ensayo de diferenciación mesectodérmica en adherente. En la figura 22D podemos ver células procedentes de NS control o de NS tratadas con ET-1, y teñidas con anticuerpos frente a SMA y GSA I. Se cuantificó la proporción de células diferenciadas GSA I⁺ o SMA⁺, pero no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células endoteliales GSA I⁺ (Figura 22E), ni en la frecuencia de células de músculo liso SMA⁺ (Figura 22F). Estos resultados podrían deberse a que el sustrato adherente es un estímulo extremadamente eficiente para inducir la diferenciación mesectodérmica, lo que ha provocado que esta diferenciación sea similar en ambas condiciones. Además de la diferenciación en sustrato adherente, se analizó también la presencia de progenitores indiferenciados en las NS mediante el ensayo de formación de NS secundarias (Figura 21G-H). Se aislaron mediante citometría de flujo los progenitores CD10⁻ y CD10⁺ de NS tratadas o no con ET-1. La figura 21G muestra dos *dot-plots* representativos de las poblaciones que fueron dispersadas a partir de NS primarias, y sembradas en cultivo. En la figura 21H podemos ver una cuantificación de la eficiencia de formación de NS secundarias. En el caso de las NS control, vemos que hay un aumento estadísticamente significativo de la formación de NS secundarias cuando sembramos las células CD10⁺, de manera similar a lo que ocurre en las células CD10⁺ aisladas de cuerpo carotídeo disperso (ver Figura 14C). Sin embargo, en el caso de las NS tratadas con ET-1, las células CD10⁺ no tienen una eficiencia de formación de NS mayor que las CD10⁻. Aunque de manera no significativa, las células CD10⁻ procedentes de NS tratadas con ET-1 sí aumentan su eficiencia de formación de NS ^{arias}. Los progenitores CD10⁻ y CD10⁺ aislados de las NS tratadas con ET-1 poseen una capacidad proliferativa similar, sugiriendo que esta citoquina promueve la proliferación

de las células madre de CB en general, pero además induce la progresión a través del linaje mesectodérmico. Aunque no hemos observado un aumento significativo en el número de células endoteliales, la ET-1 aumenta la cantidad de células $CD10^+$, pero no la formación de NS secundarias, por lo que estas células $CD10^+$ están inmersas en diferenciación mesectodérmica. En conclusión, los datos sugieren que esta citoquina podría estar promoviendo la diferenciación de las CBSCs hacia este tipo de linaje mesectodérmico, además de la activación y maduración de los progenitores restringidos hacia ese linaje.

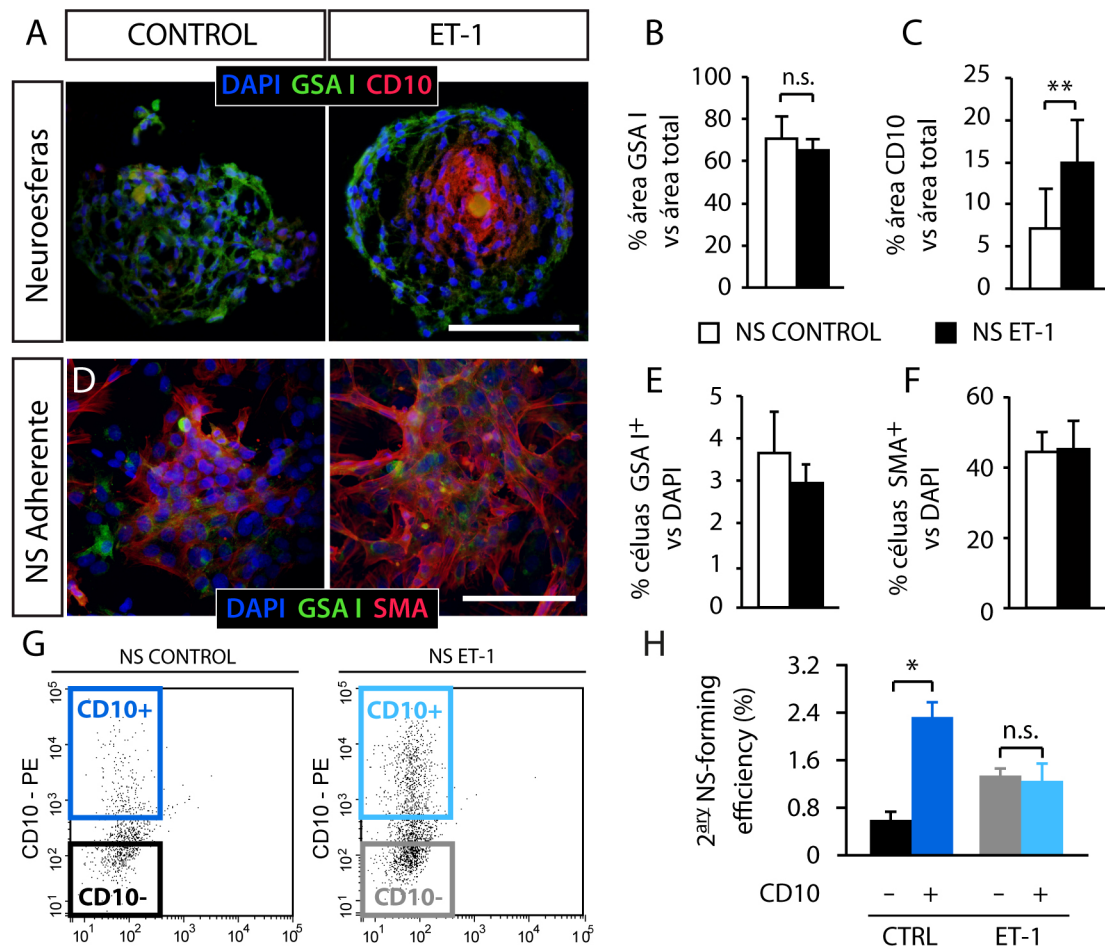


Figura 22. Efecto de la ET-1 en la diferenciación mesectodérmica de las CBSCs. A, Imágenes representativas de inmunohistoquímica de secciones de NS control y de NS tratadas con ET-1, mostrando las células marcadas con GSA I (verde), y anti-CD10 (rojo). B-C, Cuantificaciones del porcentaje del área positiva para GSA I (B) y CD10 (C) en las NS mostradas en (A). D, Imágenes representativas de inmunocitoquímica de progenitores procedentes de NS control y NS ET-1, sembradas en sustrato adherente, y sometidas a tinción frente a GSA I (verde) y anti-SMA (rojo). E-F, Cuantificaciones de células GSA I⁺ (E) y SMA⁺ (F) de las inmunocitoquímicas mostradas en (D). G, Dot-plots representativos de células CD10⁻ y CD10⁺ de NS control y ET-1 dispersadas. Las células de las NS primarias dispersas fueron marcadas con anti-CD10, y separadas mediante FACS. Posteriormente se re-sembraron en medio sin ET-1 durante 7DIV y dieron lugar a NS secundarias. H, Cuantificación de la eficiencia de formación de NS secundarias de progenitores CD10⁻ y CD10⁺ de NS (primarias) control y ET-1. ** p≤0,01; *** p≤0,001. Escala, 100 μm.

3. Análisis del efecto de la ET-1 mediante estudio de expresión génica por *microarray*

Los datos recién expuestos sobre el efecto de la ET-1 en las NS de CB claramente sugieren que esta citoquina tiene una función no sólo de activación de la proliferación sino también de inducción de la progresión a través del linaje mesectodérmico. Sin embargo, las dificultades con el ensayo adherente de NS han provocado que estas conclusiones no sean totalmente robustas. Tendríamos que utilizar algún otro método para demostrar que efectivamente el tratamiento de los progenitores de las NS con ET-1 está induciendo la progresión hacia el linaje mesectodérmico. Decidimos llevar a cabo un estudio de expresión génica por *microarray* para comparar NS tratadas *versus* no tratadas con ET-1, para así esclarecer los programas génicos que estaban activándose en los progenitores en respuesta a esta citoquina. Para este análisis, se utilizaron dos tipos de muestras de neuroesferas de CB, cultivadas en medio completo durante 10 días. La primera se nombró “NS ET-1”, y se cultivó en medio con mitógenos (EFG, FGF e IGF) más ET-1, y al 21% de O₂. La otra muestra se nombró “NS Control”, y se cultivó en medio con mitógenos y al 21% de O₂, pero sin ET-1. Por tanto, la única diferencia entre ambas muestras es la presencia de ET-1. En la figura 23A-C se muestran las dos poblaciones de NS que fueron comparadas mediante chips de *microarray*. La figura 23A muestra una imagen de campo claro de los dos tipos de NS. Como hemos mencionado anteriormente, las NS tratadas con ET-1 presentan mayor tamaño y menor cantidad de *blebs*. En la figura 23B-C podemos ver una inmunohistoquímica de secciones de estas NS, las cuales presentan un marcaje de lectina similar entre ellas. Sin embargo, el área teñida por CD10 es muy superior en las NS con ET-1, de acuerdo con lo expuesto anteriormente y con los valores de expresión obtenidos por PCR cuantitativa (Figura 23E).

En la figura 23D y G se observa que el análisis de expresión génica ha distribuido las muestras en dos grupos, que coinciden con las poblaciones tratadas con ET-1 y las poblaciones control (no tratadas), lo que denota la robustez y repetitividad de la preparación de NS. Mediante el *Volcano Plot* que se muestra en la figura 23F se puede comprobar la distribución de los genes del *microarray*, ordenados según su valor de expresión (*fold change*; en el eje X) y de significancia (p-valor o *p-value*; en el eje Y). En este tipo de representación, la región de interés la forman los puntos con valor más alto en el eje Y, y que están más alejados a la derecha o a la izquierda del punto 0 del

eje X, es decir, aquellos con un cambio más alto en la expresión génica y con mayor significancia.

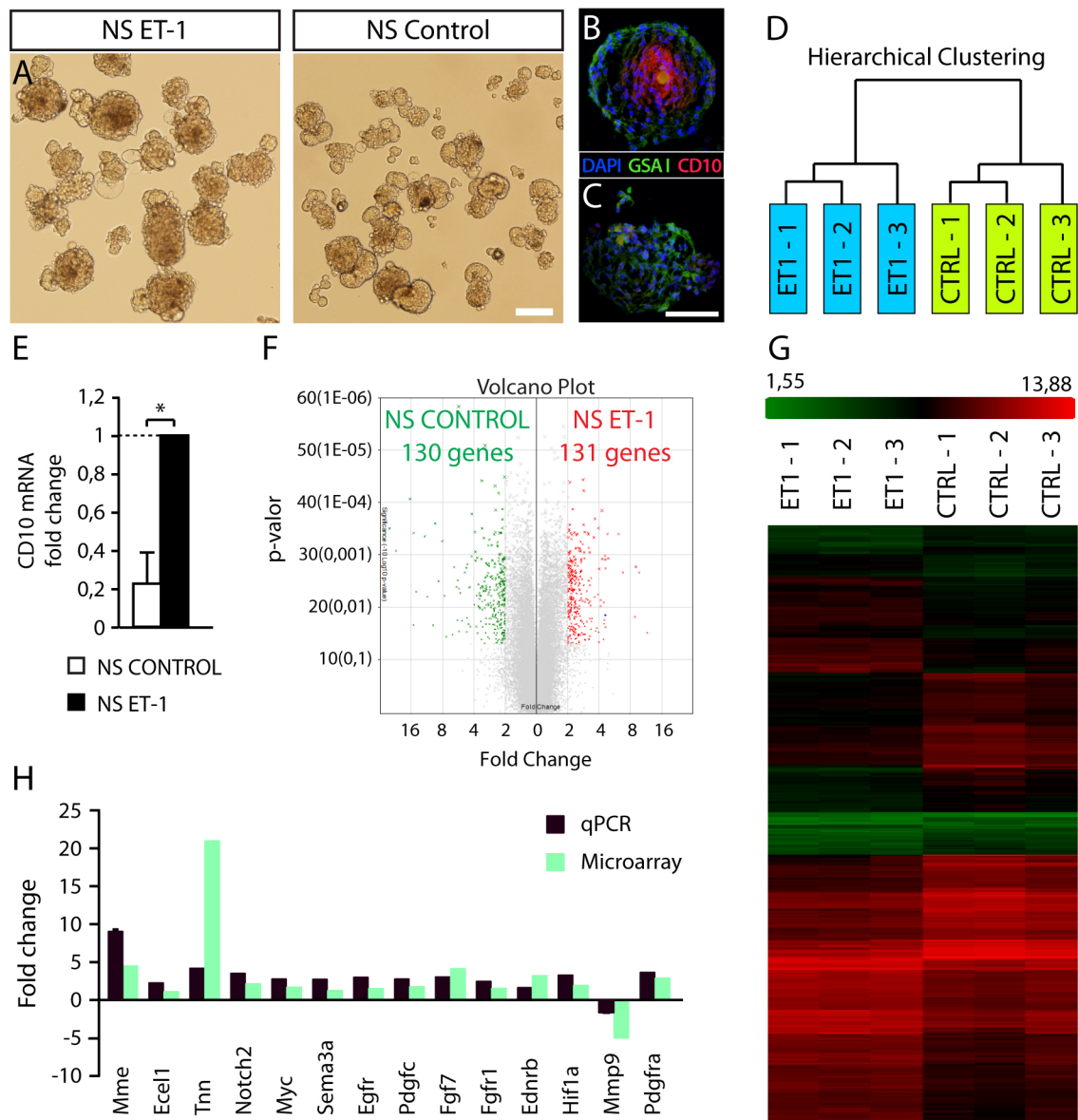


Figura 23. 3. Análisis del efecto de la ET-1 mediante estudio de expresión génica por *microarray*. **A**, Imágenes representativas de campo claro de las neuroesferas de cada una de las muestras comparadas en el análisis de expresión génica: NS tratadas con ET-1 (izquierda) y NS control (derecha). **B-C**, Inmunohistoquímica representativa de una NS tratada con ET-1 (**B**) y una NS control (**C**), ambas marcadas con GSA I (verde) y anti-CD10 (rojo). **D**, Agrupación jerárquica de las muestras utilizadas en el estudio en la que se puede ver que las condiciones de cultivo aplicadas a las células de CB han logrado dos poblaciones de células realmente diferentes. Las muestras de una misma población están relacionadas consigo mismas de forma más inmediata que con las de otra población. **E**, Niveles de expresión de CD10 en NS control y NS tratadas con ET-1, obtenidos mediante qPCR. **F**, *Volcano-plot*, gráfico que ordena los genes analizados de cada población según su p-valor (eje Y) y su FCH (eje X). **G**, Mapa de calor que proporciona una visión general de los niveles de expresión en cada muestra. **H**, Validación del *microarray* por qPCR de 14 de los principales genes. Escala, 100 μ m.

Los resultados del estudio revelaron cambios de expresión en 261 genes cuando se aplicaban unos valores de *fold change* (FCH) ≥ 2 y FDR (*p-value* ajustada) $< 0,05$. Los valores empleados para los parámetros de FCH y FDR son restrictivos y proporcionan genes con cambios importantes en la expresión y que son altamente significativos. La figura 23H muestra la comparación de los cambios de expresión de 14 de esos genes estudiado por microarray *versus* PCR cuantitativa, lo que sirve de validación de los resultados del *array*.

Como primera comprobación del análisis génico realizado, de entre los genes que superaron los filtros establecidos de (FCH > 2 y FDR (*p-value* ajustada) $< 0,05$), se examinaron genes típicos de células madre neurales. En la tabla 3 podemos encontrar 10 genes seleccionados para realizar un perfil de identidad en cada población. Entre los genes expresados en el grupo NS ET-1, se muestra en primer lugar la tenascina N o tenascina W (*Tnn* o *Tnw*), con el mayor FCH. Esta proteína se expresa en células derivadas de la cresta neural y está asociada con la fase de la migración durante el desarrollo embrionario, también se expresa en células de músculo liso y de hueso (Degen et al., 2008; Scherberich et al., 2004). A continuación encontramos la proteína modificadora de la actividad del receptor 3 (*Ramp3*), un receptor de la adrenomedulina (Dumont et al., 2002; Muff et al., 2001), una hormona cuyo papel no ha sido descrito en la fisiología del CB. Se muestra también la metalo-endopeptidasa de membrana (*Mme* o CD10), que como ya se ha mencionado se expresa en una amplia variedad de tejidos y nichos de células madre, y actúa como regulador de la diferenciación y proliferación en muchos de ellos (Maguer-Satta et al., 2011a). También encontramos la trombospondina 2 (*Thbs2*), involucrada en regulación de angiogénesis y de migración celular (Lin et al., 2003; Sanders et al., 2002), y el factor de crecimiento fibroblástico 7 (*Fgf7*), asociado a proliferación de células mesenquimales y de células epiteliales (Chelly et al., 2001; Yan et al., 1992). También se puede observar el receptor de endotelina B (*Ednrb*), cuya función en la activación de los progenitores del CB y en la diferenciación mesectodérmica de estos durante hipoxia han sido descritos (Chen et al., 2002; Chen et al., 2007a; Platero-Luengo et al., 2014a), y el receptor de factor derivado de plaquetas alfa (*Pdgfra*), que interviene en la migración de las células de la cresta neural que dan lugar a derivados mesectodérmicos (Richarte et al., 2007; Soriano, 1997).

Tabla 3. Perfil de identidad de NS control y NS ET-1.

NEUROESFERAS CON ENDOTELINA-1			NEUROESFERAS CONTROL		
Nombre	Símbolo	FCH	Nombre	Símbolo	FCH
tenascina N	Tnn	20,88	pleiotrofina	Ptn	4,53
proteína modificadora de la actividad del receptor 3	Ramp3	4,96	osteoglicina	Ogn	3,88
gremlina 1	Grem1	4,50	canal de potasio dependiente de Ca ($K_{Ca} 1.1$)	Kcnmb1	3,69
metalo-endopeptidasa de membrana	Mme	4,45	elastina	Eln	2,93
trombospondina 2	Thbs2	4,10	sinapsina II	Syn2	2,52
factor de crecimiento fibroblástico 7	Fgf7	4,07	regulador de crecimiento neuronal 1	Negr1	2,41
receptor de endotelina tipo B	Ednrb	3,17	tenascina R	Tnr	2,39
receptor de factor derivado de plaquetas alfa	Pdgfra	2,85	dopa descarboxilasa	Ddc	2,34
receptor de bradiquinina tipo B2	Bdkrb2	2,78	receptor de dopamina D2	Drd2	2,37
factor de crecimiento de transformación alfa	Tgfa	2,77	ret proto-oncogén	Ret	2,02

Por otro lado, en el grupo de NS CONTROL sobresalen genes como la dopa decarboxilasa (*Ddc*) o la sinapsina II (*Syn2*), ambos relacionados con el fenotipo neuronal (Evergren et al., 2007). No obstante, aparecen también genes como la osteoglicina (*Ogn*) o la elastina (*Eln*), relacionados con formación de tejidos óseo y cardíaco (Petretto et al., 2008), y tejido vascular (Briones et al., 2003). Todos estos tejidos derivan de la cresta neural, y estos genes muestran por tanto el perfil multipotente que tienen las NS de CB en la condición control. Los genes destacados en la población control están relacionados con pluripotencia, diferenciación neuronal y diferenciación mesectodérmica. Sin embargo, en la población de NS tratadas con ET-1 los genes que sobresalen están relacionados con células madre y con diferenciación mesectodérmica, nunca con diferenciación o fenotipo neuronal, sugiriendo de nuevo que esta citoquina especifica a los progenitores hacia el fenotipo mesectodérmico.

Los datos resultantes del análisis genético se utilizaron también para elaborar el perfil de expresión o huella genética de las NS control y de las NS tratadas con endotelina-1. La Tabla 4 muestra el perfil de expresión de las dos muestras, confeccionado con los genes que definen las dos poblaciones celulares. Para elaborar este perfil se filtraron los genes obtenidos utilizando un *fold change* alto ($FCH > 7$), y de nuevo un valor de $FDR < 0,05$. En la población de NS ET-1 obtuvimos 9 genes que cumplían dichos criterios, y en la población de NS CONTROL sólo 4 genes. El primer gen con mayor diferencia de expresión en las NS ET-1 es *BPI fold containing family A, member 2F*, expresado en epitelio pulmonar, nasal y bucal (Musa et al., 2012). La segunda proteína es la Tenascina-N, que como hemos mencionado se expresa en células derivadas de la cresta neural durante la embriogénesis y en el adulto. Las tenascinas están relacionadas con la adhesión y la migración, pudiendo ser estimulantes o inhibitoras según el tipo celular (Chiquet-Ehrismann et al., 1988; Lotz et al., 1989). La modulación de la adhesión es un mecanismo que influye en la proliferación celular, la migración y la diferenciación. La tercera proteína que obtenemos es la Interleukina 11, una citoquina que estimula el desarrollo o la supervivencia de los progenitores de osteoclasto (McCoy et al., 2013). El cuarto gen es preprotipsinógeno IV o tripsina IV, expresado en el sistema nervioso, sobre todo en astrocitos, así como en células epiteliales de intestino (Knecht et al., 2007), y su expresión está asociada a varios tipos de cáncer. La huella genética de las NS tratadas con ET-1 nos muestra que los genes

más expresados son sobre todo genes asociados a un fenotipo mesectodérmico, propio de células multipotentes derivadas de la cresta neural.

Tabla 4. Huella genética de NS control y NS ET-1.

NS ET-1			NS CONTROL		
GENE	SYMBOL	FCH	GENE	SYMBOL	FCH
BPI fold containing family A, member 2F	Bpifa2f	22,22	complement component 7	C7	8,72
tenascin N	Tnn	20,88	RT1 class II, locus Da	RT1-Da	7,36
interleukin 11	Il11	16,84	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	Gucy1a3	7,23
preprotrypsinogen IV	LOC286960	16,15	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Adipoq	7,07
BPI fold containing family A, member 2	Bpifa2	11,55			
secretory leukocyte peptidase inhibitor	Slpi	11,29			
regenerating islet-derived 3 beta	Reg3b	9,66			
cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide	Cyp26b1	8,22			
C-type lectin domain family 2 member D-like 1	Clec2dl1	8,16			

El gen con mayores diferencias de expresión en las NS CONTROL es el componente del complemento 7 (*C7*), el cual codifica para una de las proteínas que forma el sistema del complemento, implicado en la respuesta inmunitaria. El segundo gen es RT1 clase II, locus Da (*RT1-Da*), que codifica el antígeno E, clase II, de la familia MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) 2, también relacionado con la respuesta inmunitaria. La tercera proteína del perfil de expresión es la guanilato ciclasa 1 (*Gucyl1a3*), implicada en la diferenciación de células madre embrionarias (Sharin et al., 2011). Por último, obtenemos el gen *adiponectina* (*Adipoq*), cuya proteína regula el nicho de células madre mesenquimales de la médula ósea (Yu et al., 2015). Son por tanto un grupo muy heterogéneo de genes los obtenidos en la población control, y que no apuntan hacia ningún fenotipo celular concreto.

3.1. Funciones biológicas representadas en los progenitores del cuerpo carotídeo tratados o no con ET-1

Los genes diferencialmente expresados entre ambas muestras se utilizaron también para estudiar posibles agrupaciones con significado biológico, incluida la presencia de rutas de señalización destacadas. Para este objetivo se empleó el programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (ver apartado 6.3.4 de Materiales y métodos). Este software proporciona un modo de examinar e interpretar el significado biológico de los datos genómicos a través de un análisis bioinformático. El programa ayuda a descubrir las conexiones causales ocultas en los datos e identifica las relaciones, mecanismos, funciones y rutas de interés dentro de la lista de genes expresados diferencialmente, de nuevo basándonos en los parámetros de $FCH \geq 2$ y $FDR < 0,05$. De esta manera, se obtuvo un listado con los genes altamente expresados en cada población de neuroesferas, con el que se llevó a cabo un estudio de *IPA Core Analysis*. Este análisis proporciona información sobre las rutas de señalización, redes moleculares y procesos biológicos que están significativamente representados en el conjunto de datos. El programa IPA muestra las funciones biológicas como “biofunciones” (en inglés *biofunctions*), que son agrupadas en diferentes categorías (en inglés *categories*). Las biofunciones constituyen la información más relevante y específica, y las categorías se emplean para agrupar biofunciones similares y tener así una visión más general de los procesos que aparecen resaltados en cada una de las muestras.

La Figura 24 muestra las biofunciones destacadas en la muestra NS ET-1 *versus* las NS Control. Como se puede observar, en las NS tratadas con ET-1 aparecen biofunciones asociadas al linaje mesectodérmico del CB. Por otro lado, en las NS Control vemos que aparecen representadas biofunciones asociadas al sistema nervioso.

Figura 24. Funciones destacadas en NS ET-1 *versus* NS Control.

Category	Diseases or Functions Annotation	p-Value	Predicted Activation State	Activation z-score	# Molecules
Cell Cycle	mitosis	4,00E-15	Increased	3,040	75
	segregation of chromosomes	2,21E-12	Increased	1,510	25
	cell cycle progression	3,17E-11	Increased	2,817	116
Cell Morphology	morphology of cells	9,94E-10	Increased	0,243	191
	branching of endothelial cells	2,60E-07	Increased	2,172	16
	abnormal morphology of mitotic spindle	2,80E-06	Increased		7
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	2,55E-10	Increased	6,458	308
	proliferation of tumor cell lines	1,57E-09	Increased	4,317	149
	proliferation of hepatoma cell lines	9,87E-08	Increased	2,468	28
	proliferation of muscle cells	5,19E-07	Increased	1,081	46
Cellular Movement	cell movement	1,68E-11	Increased	6,366	199
	cell movement of tumor cell lines	3,36E-11	Increased	4,874	94
	migration of cells	2,16E-10	Increased	6,164	179
Connective Tissue Development and Function	morphology of elastic tissue	1,38E-05	Increased		6
	mass of adipose tissue	2,33E-05	Increased	0,768	25
Nervous System Development and Function	neurotransmission	1,85E-12	Decreased	1,038	65
	synaptic transmission	6,17E-12	Decreased	1,379	56
	abnormal morphology of nervous system	5,53E-11	Decreased	-3,400	97
Neurological Disease	morphology of nervous system	6,09E-11	Decreased	-3,386	103
	seizure disorder	7,54E-18	Decreased	-3,378	81
	epilepsy	3,43E-16	Decreased	-1,432	57
	seizures	2,14E-15	Decreased	-3,243	70
	Movement Disorders	3,46E-13	Decreased	-4,418	133

Las Figuras 25 y 26 muestran las categorías más destacadas en las NS tratadas con ET-1 y en las NS control, respectivamente. Para seleccionar las categorías más relevantes se ha fijado un valor de $[-\log(p\text{-value})] > 1,3$, y se han elegido las 25 categorías con mayor significancia.

Figura 25. Categorías destacadas en NS ET-1.

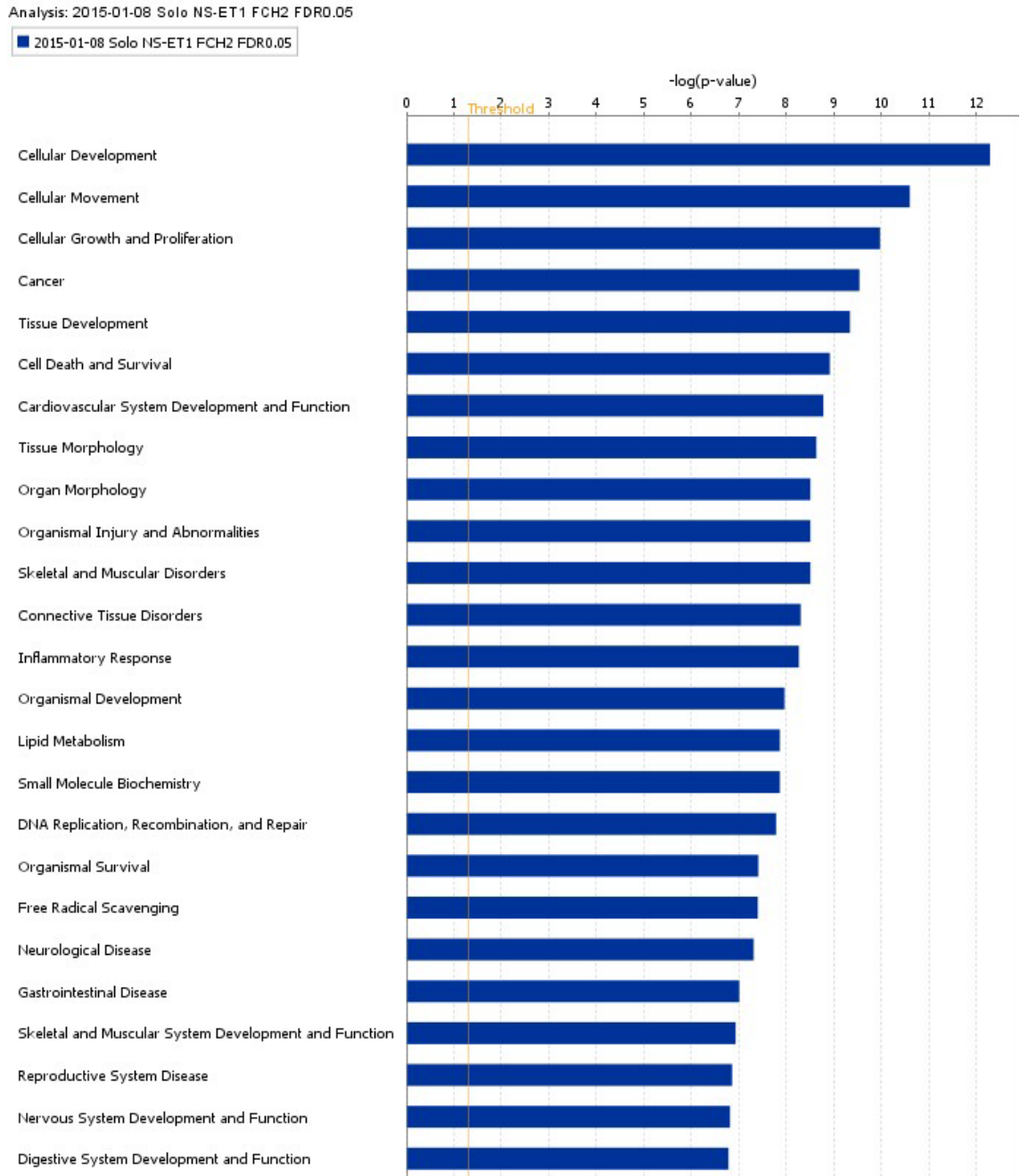
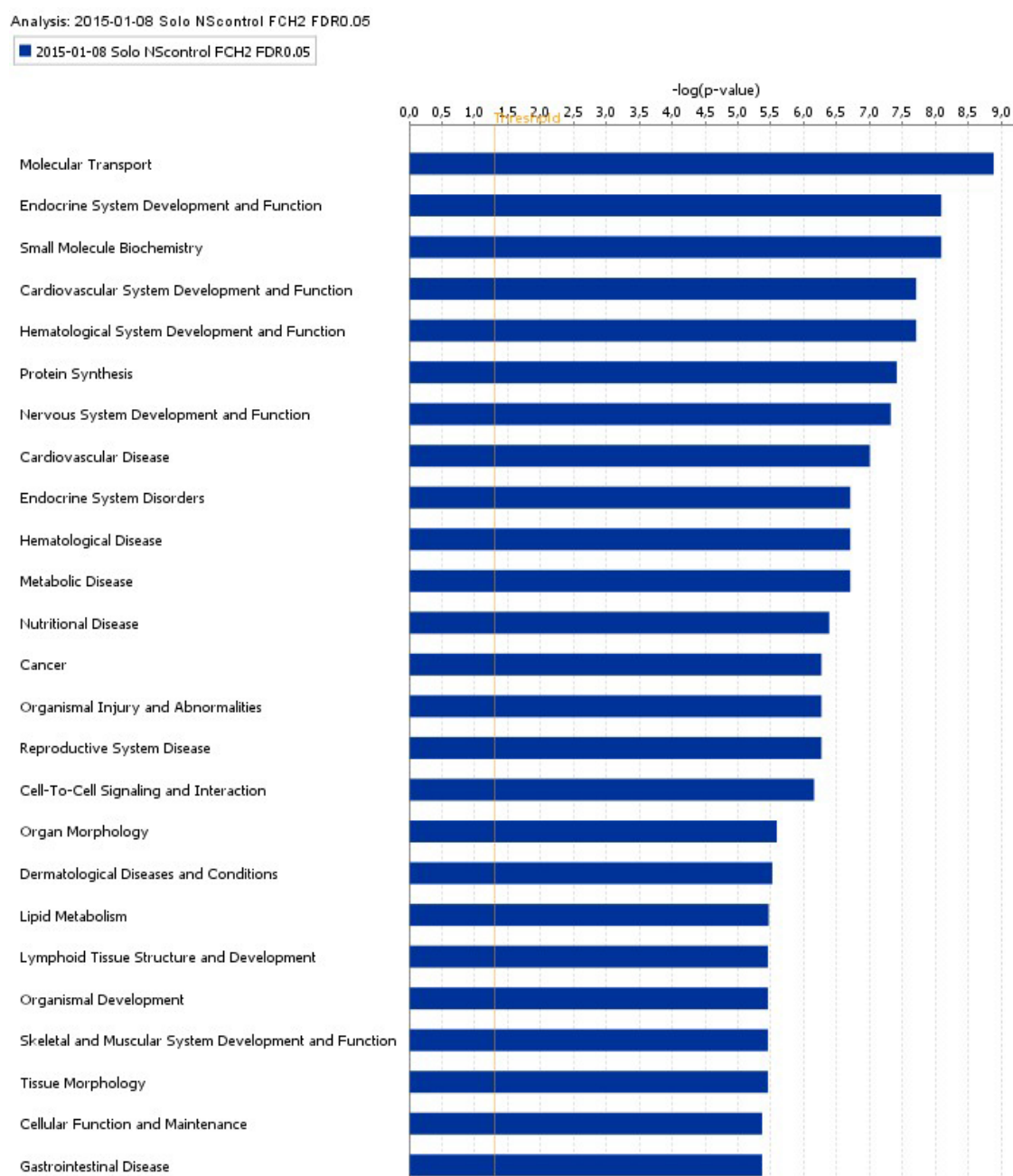


Figura 26. Categorías destacadas en NS CONTROL.



A continuación, se muestran dos tablas con las biofunciones más representadas en cada muestra (Tablas 5 y 6). Las biofunciones obtenidas para cada población demuestran de nuevo que existen diferencias entre las NS ET-1 y las NS control, y que los procesos representados correlacionan con los fenotipos esperados para cada población.

Tabla 5. Biofunciones destacadas en NS ET-1.

NS ET-1 Categories	Biofunctions	p-Value	# Molecules	Predicted Activation State	Activation z-score
Cancer	growth of tumor	2,95E-10	27	Increased	2,792
	growth of malignant tumor	3,30E-09	19	Increased	2,486
	advanced tumor	4,36E-08	25		1,871
	metastasis	1,21E-07	23		1,871
	advanced malignant tumor	1,73E-07	24		1,871
	growth of carcinoma	2,05E-07	10		1,492
	development of tumor	3,57E-06	13		0,838
	metastatic cancer	1,33E-05	12		
	adenoma	2,62E-05	11		0,063
	upper aero-digestive squamous cell carcinoma	3,89E-05	9		
	quantity of tumor	4,28E-05	7		1,075
	sarcoma	4,60E-05	12		0,325
	connective or soft tissue tumor	6,82E-05	13		0,325
	benign connective or soft tissue neoplasm	8,73E-05	5		
	head and neck cancer	1,18E-04	17		0,655
	neoplasia of cells	1,23E-04	12	Increased	2,428
	squamous-cell carcinoma	1,38E-04	16		
Cardiovascular System Development and Function	angiogenesis	1,69E-09	27	Increased	2,625
	development of cardiovascular system	3,33E-09	32	Increased	2,303
	vasoconstriction of blood vessel	2,78E-05	7		0,000
	vascularization	1,69E-04	9		1,068
	response of heart	2,50E-04	5		
	morphology of cardiovascular system	3,42E-04	16		
	neovascularization	3,67E-04	7		
	abnormal morphology of cardiovascular system	3,94E-04	15		
	function of blood vessel	6,24E-04	3		
	cell viability of endothelial cell lines	3,41E-04	3		
	branching of endothelial cells	1,67E-05	6		1,741
	sprouting of vascular endothelial cells	1,48E-04	4		1,980
	cell movement of endothelial cells	1,90E-04	11		1,854
	migration of endothelial cells	3,93E-04	10		1,800
	development of blood vessel	1,11E-08	28	Increased	2,282
	vasculogenesis	8,72E-08	25	Increased	2,220
	angiogenesis of connective tissue	4,68E-06	4		
	morphology of blood vessel	3,35E-06	12		1,980

Continuación de Tabla 5. Biofunciones destacadas en las NS ET-1.

NS ET-1 Categories	Biofunctions	p-Value	# Molecules	Predicted Activation State	Activation z-score
Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	1,14E-08	32		-0,294
	cell death of tumor cell lines	2,94E-07	34		-0,520
	apoptosis of endometrial cancer cell lines	6,71E-06	4		-0,320
	apoptosis of leukemia cell lines	9,57E-06	11		1,341
	necrosis of epithelial tissue	1,27E-05	17		-1,575
	cell death of epithelial cells	1,62E-05	15		-1,652
	apoptosis of epithelial cells	2,06E-05	11		-1,714
	neuronal cell death	3,40E-05	18		0,751
	cell death of muscle cells	8,09E-05	11	Decreased	-2,452
	cell death of parenchymal cells	2,38E-04	7		-0,543
	apoptosis of primordial germ cells	3,04E-04	2		
	cell viability of stem cells	6,94E-04	4		
Cellular Development	differentiation of cells	5,26E-13	54	Increased	3,180
	differentiation of neuronal hybrid cells	1,02E-04	2		
	maturation of cells	4,01E-04	12	Increased	2,073
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	1,08E-10	68	Increased	3,080
	colony formation of cells	4,52E-08	19		1,258
	colony formation of tumor cell lines	5,57E-05	10		1,318
	proliferation of bone marrow cell lines	5,39E-04	5	Increased	2,000
Cellular Growth and Proliferation, Tissue Development	proliferation of connective tissue cells	4,65E-10	24	Increased	2,107
	proliferation of epithelial cells	4,04E-08	19	Increased	2,001
	generation of leukocytes	3,85E-04	7		1,925
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	3,11E-10	25	Increased	3,241
	cell movement of tumor cell lines	1,16E-09	27	Increased	3,471
	cell movement of muscle cells	2,50E-06	10		0,928
	invasion of cells	2,86E-06	22	Increased	2,459
	migration of colon carcinoma cells	1,00E-05	3		
	migration of prostate cancer cell lines	3,72E-05	6		1,945
	invasion of tumor cell lines	1,89E-04	15	Increased	2,313
Connective Tissue Disorders, Organismal Injury and Abnormalities, Skeletal and Muscular Disorders, Tissue Morphology	damage of cartilage tissue	5,05E-09	9		0,518
	damage of bone	3,17E-09	11		0,730
	deterioration of connective tissue	2,38E-09	12		0,686
	quantity of cells	8,64E-08	38	Increased	2,034
Organ Morphology, Organismal Injury and Abnormalities, Skeletal and Muscular Disorders, Tissue Morphology	abnormal morphology of epithelial tissue	2,38E-05	14		

Tabla 6. Biofunciones destacadas en NS control.

NS CONTROL Categories	Biofunctions	p-Value	# Molecules	Predicted Activation State	Activation z-score
Cardiovascular Disease	vascular disease	9,88E-08	26		-0,157
	occlusion of artery	1,03E-06	19		-0,155
	atherosclerosis	1,19E-06	16		0,104
	Hypertension	1,21E-06	19		1,320
	disorder of artery	4,48E-06	20		-0,068
	arteriovenous malformation	1,00E-04	3		
	abdominal aortic aneurysm	1,22E-04	4		
	instability of atherosclerotic lesion	2,75E-04	2		
	abnormal ST segment	5,47E-04	2		
	injury of aorta	5,47E-04	2		
	atherosclerosis of aortic sinus	9,06E-04	2		
	abnormality of cardiovascular system	1,73E-03	3		
	reperfusion injury	1,80E-03	4		
	vasospasm	1,88E-03	2		
	essential hypertension	2,82E-03	4		
	Infarction	3,03E-03	8		0,838
	peripheral arterial occlusive disease	4,80E-03	6		
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease	female genital tract cancer	5,39E-07	50		
	genital tract cancer	3,10E-06	52		
	uterine serous papillary cancer	8,33E-06	10		
	genital tumor	1,86E-05	52		
	endometrial cancer	5,42E-05	41		
	endometrial carcinoma	2,10E-03	34		
	adenocarcinoma in endometrium	3,13E-03	33		
	HER2 negative hormone receptor negative breast cancer	5,08E-03	5		
	blood pressure	1,95E-08	15		1,495
	systolic pressure	1,96E-08	10		1,942
Cardiovascular System Development and Function, Hematological System Development and Function	diastolic pressure	2,81E-06	6		1,664
	mean arterial pressure	3,08E-05	6		1,546
	systolic pressure of right ventricle	2,49E-03	2		
	secretion of catecholamine	6,96E-07	7		0,000
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	secretion of neurotransmitter	6,56E-06	8		0,000
	quantity of catecholamine	2,15E-05	8		-0,849
	uptake of 5-hydroxytryptamine	2,49E-03	2		
	uptake of neurotransmitter	4,96E-03	3		

Continuación de Tabla 6. Biofunciones destacadas en las NS CONTROL.

NS CONTROL Categories	Biofunctions	p-Value	# Molecules	Predicted Activation State	Activation z-score
Endocrine System Development and Function, Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	concentration of corticosterone	2,15E-04	6		1,554
	oversecretion of corticosterone	2,75E-04	2		
	concentration of anandamide	3,18E-03	2		
	quantity of insulin in blood	2,15E-05	9		0,333
	quantity of IGF1 in blood	1,53E-03	3		
	quantity of ACTH in blood	5,72E-03	2		
	concentration of hormone	8,12E-09	18		-0,767
	quantity of ACTH	2,95E-04	3		
	secretion of hormone	4,05E-04	6		1,091
	abnormal quantity of hormone	4,26E-04	4		
Endocrine System Disorders, Hematological Disease, Metabolic Disease	quantity of pituitary hormone derivative	1,35E-03	2		
	hypoglycemia	1,96E-07	9	Increased	2,777
	secretion of molecule	1,29E-09	22		-0,722
	transport of molecule	2,85E-08	37	Decreased	-2,276
	transport of monovalent inorganic cation	4,40E-05	9		
	transport of metal	6,08E-05	11		
	transport of cation	9,81E-05	12		-1,980
	transport of inorganic cation	1,05E-04	11		
	transport of K+	1,19E-04	6		
	transport of metal ion	1,88E-04	10		
Nervous System Development and Function	transport of ion	3,77E-04	13	Decreased	-2,213
	import of K+	3,95E-03	2		
	abnormal morphology of nervous system	4,76E-08	23		
	activation of brain	1,47E-05	5		
	lack of superior cervical ganglion	9,23E-05	2		
	abnormal morphology of superior cervical gang	4,48E-04	3		
	weight gain	4,10E-07	14		1,604
	obesity	1,05E-05	15		0,289
	central obesity	2,95E-04	3		
	quantity of protein in blood	3,85E-08	20	Increased	1,835
Protein Synthesis	quantity of cytokine	1,54E-03	8		2,094
	quantity of leptin in blood	2,23E-03	5		0,447

En la tabla 5 podemos ver que, además de los procesos biológicos propios de células progenitoras, en las NS tratadas con endotelina aparecen otros procesos relacionados con el linaje mesectodérmico de la cresta neural, como son la proliferación de células de tejido conectivo o la angiogénesis. Estas funciones hacen referencia a tejidos derivados de dicha estructura germinal, tales como músculo liso, tejido vascular, conectivo, y óseo, reafirmando la multipotencia de las CBSCs. La presencia de estas biofunciones en las NS ET-1 indica que está teniendo lugar cierta especificación o diferenciación hacia el linaje mesectodérmico en el núcleo de las neuroesferas tratadas con la citoquina. Asimismo, los datos obtenidos en este análisis génico apoyan los resultados del *microarray* realizado anteriormente (Platero-Luengo, 2014b), confirmando que las CBSCs son progenitores multipotentes capaces de generar células de fenotipo neuronal y células de fenotipo mesectodérmico, y que se requieren señales específicas del microambiente para promover la diferenciación hacia uno u otro linaje.

Por último, se seleccionaron las 5 biofunciones más destacadas según el p-valor o el *z-score*. En la Tabla 7 podemos ver que en la muestra de NS tratadas con ET-1 aparecen biofunciones relacionadas con proliferación o crecimiento de células y del organismo, o con movimiento celular. Además, en esta muestra aparecen biofunciones relacionadas con el linaje mesectodérmico, como es la proliferación de células de tejido conectivo. Por el contrario, en las NS control las biofunciones son de características más variadas, apareciendo algunas como el transporte de moléculas, la concentración de hormonas o la inflamación del órgano. De manera relevante, las biofunciones más destacadas en la muestra control están relacionadas con un fenotipo neuronal, y no aparecen entre las biofunciones destacadas de la muestra tratada con ET-1, como por ejemplo la biofunción proliferación de células neuronales.

Tabla 7. Las 5 biofunciones más destacadas en las NS ET-1 y NS CONTROL.

	Biofunciones NS ET-1	Biofunciones NS CONTROL
top-5 z-score	Organismal death Cell survival Perinatal death Growth of organism Cell viability	Glucose metabolism disorder Hypoglycemia Proliferation of neuronal cells Inflammation of organ Quantity of cells
top-5 p-value	Differentiation of cells Cell movement Growth of tumor Migration of tumor cell lines Proliferation of connective tissue cells	Secretion of molecule Concentration of hormone Transport of molecule Systolic pressure Blood pressure

3.2. Rutas de señalización representadas en los progenitores del cuerpo carotídeo tratados o no con ET-1

El *Core Analysis* utilizado para analizar los genes de las NS ET-1 y de las NS control proporcionó, además de las biofunciones, una serie de rutas de señalización canónicas asociadas a las moléculas representadas en cada población de neuroesferas. Estas rutas aparecen ordenadas en las Tablas 8 y 9 según el valor de *p-value*. Las tablas muestran también el Ratio, un parámetro que mide la relación entre las moléculas de nuestros datos que aparecen en dicha ruta y las moléculas totales de la ruta en cuestión.

Tabla 8. Rutas de señalización canónicas destacadas en NS ET-1.

Ingenuity Canonical Pathways en NS ET-1	-log(p-value)	Ratio
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	3,83	0,15
PPAR Signaling	3,09	0,07
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	2,93	0,09
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2,89	0,04
Eicosanoid Signaling	2,82	0,08
PCP pathway	2,79	0,08
Prostanoid Biosynthesis	2,68	0,29
Ovarian Cancer Signaling	2,62	0,05
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	2,56	0,05
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	2,37	0,06
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	2,30	0,03
Hepatic Cholestasis	2,20	0,04
PXR/RXR Activation	2,00	0,07
L-cysteine Degradation II	1,99	1,00
Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	1,99	0,04
Role of Wnt/GSK-3 β Signaling in the Pathogenesis of Influenza	1,97	0,07
LXR/RXR Activation	1,91	0,05
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1,86	0,04
Basal Cell Carcinoma Signaling	1,80	0,06
IL-10 Signaling	1,72	0,05
Neuregulin Signaling	1,72	0,05
1,25-dihydroxyvitamin D3 Biosynthesis	1,70	0,50
Sulfate Activation for Sulfonation	1,70	0,50
Cysteine Biosynthesis/Homocysteine Degradation	1,70	0,50
Glycogen Biosynthesis II (from UDP-D-Glucose)	1,70	0,50
UDP-N-acetyl-D-galactosamine Biosynthesis II	1,70	0,50
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	1,66	0,05
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	1,56	0,03
UDP-N-acetyl-D-glucosamine Biosynthesis II	1,52	0,33
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	1,52	0,07
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza	1,52	0,07
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	1,49	0,07
Inhibition of Matrix Metalloproteases	1,49	0,07
G-Protein Coupled Receptor Signaling	1,41	0,03
Myo-inositol Biosynthesis	1,40	0,25
Graft-versus-Host Disease Signaling	1,33	0,06
Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells	1,31	0,06
Adipogenesis pathway	1,31	0,04

En la Tabla 8 se puede observar que muchas de las rutas que aparecen en las NS con ET-1 están asociadas con proliferación celular y células madre. Otras son específicas de tejido óseo, están relacionadas con hematopoyesis, o están implicadas en cáncer de células gliales. Por otro lado, las vías de señalización presentes en NS Control están relacionadas con células madre, pero de nuevo aparecen vías relacionadas con biología neuronal. Sin embargo, las rutas destacadas de las NS ET-1 están poco asociadas al sistema nervioso.

Tabla 9. Rutas de señalización canónicas destacadas en NS Control.

Inguenuity Canonical Pathways en NS Control	-log(p-value)	Ratio
Inhibition of Angiogenesis by TSP1	3,05	0,15
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	2,40	0,04
Renin-Angiotensin Signaling	2,19	0,05
Type II Diabetes Mellitus Signaling	2,02	0,05
Glycerol-3-phosphate Shuttle	2,02	1,00
Gai Signaling	1,99	0,05
GDNF Family Ligand-Receptor Interactions	1,88	0,06
GABA Receptor Signaling	1,88	0,06
Reelin Signaling in Neurons	1,78	0,05
Dopamine Receptor Signaling	1,76	0,05
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	1,74	0,04
1,25-dihydroxyvitamin D3 Biosynthesis	1,72	0,50
Glutathione-mediated Detoxification	1,69	0,09
Oncostatin M Signaling	1,62	0,08
UVC-Induced MAPK Signaling	1,56	0,07
Glycerol Degradation I	1,54	0,33
PPARα/RXRα Activation	1,54	0,03
IL-8 Signaling	1,52	0,03
RAR Activation	1,50	0,03
G-Protein Coupled Receptor Signaling	1,48	0,03
Sperm Motility	1,42	0,04
Serotonin Receptor Signaling	1,40	0,06
Sphingosine-1-phosphate Signaling	1,38	0,04
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	1,34	0,04
FXR/RXR Activation	1,31	0,04

El análisis de los datos del *microarray* apoya los resultados obtenidos en los cultivos celulares, por lo que pensamos que la adición de endotelina-1 induce no sólo la proliferación sino también la diferenciación mesectodérmica de las CBSCs multipotentes. Creemos que esta citoquina induce la conversión de las CBSCs hacia progenitores mesectodérmicos positivos para CD10, que dejan de ser multipotentes y que quedan a disposición de la señalización del nicho para, en un momento determinado, madurar y dar lugar a nuevas células vasculares. Como hemos descrito en

anteriores apartados, el estímulo hipóxico parece ser el encargado de activar a los progenitores CD10⁺. Durante la hipoxia tiene lugar una importante liberación de factores, entre los que se encuentra la endotelina. Nuestros resultados indican que el efecto de la ET-1 es más visible si estudiamos la población de células CD10⁺ y que, probablemente, el efecto de la citoquina sobre la diferenciación mesectodérmica está mediado por la proteína CD10, tal y como ocurre en otros sistemas. No obstante, serán necesarios ensayos adicionales para confirmar el papel que ejerce CD10 a través de la degradación de ET-1 en el CB durante normoxia e hipoxia. En condiciones de hipoxia, la bajada de la expresión de CD10 es un claro indicador de la ausencia de degradación por parte de esta endopeptidasa de membrana, tanto de ET-1 como de otros péptidos señalizadores, y esta falta de degradación origina una sensibilización de las células hacia estos factores, promoviéndose por tanto la diferenciación endotelial y la angiogénesis.

Discusión

Discusión

1. Linajes celulares del cuerpo carotídeo: plasticidad de las CBSCs

El cuerpo carotídeo es un órgano que deriva de la cresta neural, una de las estructuras más multipotentes en los vertebrados durante el desarrollo (Weston y Thiery, 2015). Desde el descubrimiento de las células de la cresta neural, existe un amplio debate acerca de si éstas son verdaderamente multipotentes (Baggiolini et al., 2015; Baroffio et al., 1988; Bronner-Fraser y Fraser, 1989; Bronner-Fraser y Fraser, 1988; Dupin et al., 2010; McKinney et al., 2013; Stemple y Anderson, 1992), o en cambio constituyen una población heterogénea de progenitores restringidos (Harris y Erickson, 2007; Henion y Weston, 1997; Krispin et al., 2010). El cuerpo carotídeo deriva de la región craneal (LaBonne y Bronner-Fraser, 1998), una de las zonas más plásticas de la cresta neural, que da lugar tanto a tejidos mesenquimales como neurales (Dupin y Le Douarin, 2014). Resultados recientes de nuestro grupo han mostrado que la célula madre del CB es capaz de dar lugar a células neuronales y a células de linaje mesectodérmico (Annese et al., en revisión; Pardal et al., 2007), lo que indicaría que estas células madre son verdaderamente multipotentes, y que retienen esta plasticidad, propia de las NCSCs, durante la vida adulta. Aunque aún no está totalmente determinado si las células tipo II o CBSCs provienen de progenitores neurales o de células madre mesenquimales derivadas de la cresta neural (Kameda et al., 2012; KamedaY, 2005; Pardal et al., 2007), su procedencia craneal las hace idóneas para originar simultáneamente derivados neurales y mesectodérmicos (LaBonne y Bronner-Fraser, 1998). Asimismo, diversos análisis genéticos realizados por nuestro grupo anteriormente a esta tesis doctoral (Platero-Luengo, 2014b) evidencian que existe expresión de genes relacionados con los fenotipos neuronal y mesectodérmico en las células madre del CB, confirmando la multipotencia de estas células. A raíz de estos análisis genéticos hemos podido aislar un progenitor restringido hacia el linaje mesectodérmico de este nicho germinal. Los progenitores CD10 positivos derivan de la célula madre del CB, y nuestros resultados apuntan a que su presencia en el órgano está destinada a contribuir a la angiogénesis en situaciones de hipoxia crónica.

El modelo por el que se explica la activación de la célula madre del CB (Pardal et al., 2007) está inspirado en modelos propuestos para explicar la neurogénesis en el CNS (Álvarez-Buylla et al., 2001; Doetsch, 2003). Existen muchas similitudes entre el cuerpo carotídeo y los nichos neurogénicos del CNS. Sin embargo, a diferencia de la SVZ o la SGZ, el centro germinal del CB no está permanentemente activo, sino que se moviliza durante la aclimatación del órgano a la hipoxemia mantenida. Los nichos neurogénicos del CNS adulto han sido estudiados en profundidad (Álvarez-Buylla et al., 2001; Doetsch, 2003; Seri et al., 2006; Temple y Álvarez-Buylla, 1999), y hoy en día se han descrito marcadores moleculares de los principales tipos celulares que los componen (Beckervordersandforth et al., 2010; Codega et al., 2014). La descripción detallada del funcionamiento de estos nichos es crucial para la utilización de las NSCs que residen en ellos, para terapia celular frente a enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la falta de marcadores específicos que permitan aislar las células madre neurales, las cuales suelen encontrarse en pequeño número y muy mezcladas con otros tipos celulares, ha dificultado su aplicación. Esta es una complicación que se da también en los nichos de células madre del PNS, cuyas poblaciones celulares han sido descritas en los últimos años (Bixby et al., 2002; Hagedorn et al., 1999; Kruger et al., 2002; Nagoshi et al., 2008; Pardal et al., 2007). El cuerpo carotídeo es un importante quimiosensor del linaje simpatoadrenal derivado de la cresta neural (Pearse et al., 1973), que mantiene una población de células madre adultas (Pardal et al., 2007) dentro de un complejo nicho cuyos componentes están siendo estudiados en la actualidad. Las células madre y los progenitores del CB pueden detectarse con marcadores intracelulares como GFAP y Nestina. Sin embargo, no disponemos de otros marcadores que nos permitan aislar células vivas mediante citometría de flujo. La proteína CD10 surge del análisis de expresión génica en el nicho germinal del CB como el marcador de membrana más expresado en células indiferenciadas (Platero-Luengo, 2014b). Esta endopeptidasa nos ha permitido aislar progenitores de CB mediante FACS. Además, hemos comprobado que más de un tercio de las células madre del CB co-expresan CD10 a distintos niveles, indicando una fuerte asociación entre CD10 y la fisiología de las células madre de este nicho. El marcador CD10 permite por tanto estudiar una subpoblación de progenitores del CB mediante citometría de flujo.

Tal y como confirman los estudios de trazado celular realizados con el ratón *GFAP-CRE/ROSA26*, las células CD10⁺ proceden de la célula madre GFAP⁺ del CB.

Sin embargo, el papel que esta subpoblación de células CD10⁺ juega dentro del órgano es poco conocido. CD10 se expresa en una amplia variedad de tejidos y ha sido definido como marcador de superficie de células madre en muchos de ellos, por ejemplo en médula ósea (Galy et al., 1998), tejido adiposo (Buhring et al., 2007), pulmón (Sunday et al., 1992) o mama (Bachelard-Cascales et al., 2010; Stingl et al., 2005). La asociación entre CD10 y la fisiología de células madre eleva el interés médico y terapéutico acerca del funcionamiento de esta proteína. La subpoblación CD10⁺ identificada en el cuerpo carotídeo forma *in vitro* más neuroesferas y de mayor tamaño que la subpoblación CD10⁻. Estos resultados sugieren que CD10 está asociado a la proliferación en el CB, al igual que ocurre en otros nichos de células madre (Bachelard-Cascales et al., 2010; Stingl et al., 2005). Al proporcionarles las condiciones adecuadas para la diferenciación, los progenitores CD10⁺ son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia el linaje mesectodérmico del CB, es decir, células de músculo liso y células endoteliales. Sin embargo, esta subpoblación de progenitores CD10⁺ parece haber perdido totalmente la capacidad de diferenciación hacia células neuronales, capacidad que sí retiene la subpoblación de progenitores CD10 negativos. Este resultado indica que los progenitores CD10⁺ están restringidos, especificados, que no son multipotentes, y que sólo se diferencian hacia células del linaje mesectodérmico de cuerpo carotídeo.

Los estudios de la subpoblación CD10⁺ muestran que CD10 es un marcador expresado en un amplio rango de tipos celulares del CB, y que además de estar asociado a los progenitores, se expresa también en células diferenciadas del nicho, como las células de músculo liso (SMA⁺) o las células endoteliales (GSA I⁺ y CD31⁺). Aunque CD10 es una proteína que se encuentra principalmente en células epiteliales, también se ha localizado en células endoteliales de venas y arterias en otros tejidos (Bronner-Fraser y Fraser, 1989; Johnson et al., 1985). En concordancia con estos estudios, nuestros experimentos inmunohistoquímicos muestran que las células más positivas para CD10 en el CB se asocian a las arterias. Hemos estudiado en detalle la co-expresión de CD10 *ex vivo*, ya que debido a complicaciones técnicas no pudimos analizar la co-expresión de este marcador con otros marcadores *in vivo*. Aunque el porcentaje de células CD10⁺ que co-expresan CD31 es bajo, la co-expresión de SMA y de GSA I indica que CD10 está claramente asociado a la progresión a lo largo del linaje mesectodérmico del CB. La endopeptidasa se expresa desde células todavía Nestina y/o GFAP positivas, hasta células SMA o GSA I positivas, pasando por una alta expresión en progenitores

restringidos hacia este linaje. En cualquier caso, se requieren estudios adicionales para conocer mejor el papel de CD10 en la maduración de las células mesectodérmicas del CB en respuesta a hipoxia.

En concordancia con la ausencia de diferenciación neuronal observada en los progenitores CD10⁺, los análisis de expresión e inmunocitoquímicos llevados a cabo muestran que las células CD10⁺ no expresan el marcador neuronal tirosina hidroxilasa (TH). De hecho, la expresión de TH y de CD10 es mutuamente excluyente, indicando que *in vivo* la proteína CD10 no está presente en las células glómicas del CB, al menos a niveles apreciables mediante citometría de flujo. Los progenitores CD10⁻, que incluyen a las células madre multipotentes del órgano, también poseen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje mesectodérmico del CB. Parece por tanto que la CBSC elige el linaje hacia el que se va a diferenciar en respuesta a la señalización presente en el nicho, y en cualquier caso antes de expresar CD10. Nuestros resultados sugieren que la expresión de CD10 está limitada a aquellas células madre que han tomado la decisión de iniciar su diferenciación hacia el linaje mesectodérmico, a los progenitores restringidos hacia este linaje, y a las células musculares y células endoteliales propias de este linaje. Entender los procesos por los cuales las CBSCs toman estas “decisiones” de linaje, es clave para el futuro uso de estas células en terapia celular frente a enfermedades del sistema nervioso.

2. Papel de CD10 en el nicho germinal del cuerpo carotídeo

La actividad enzimática de CD10 confiere a esta proteína una importante función reguladora de diferenciación y proliferación de células progenitoras en varios nichos germinales (Bachelard-Cascales et al., 2010). En el presente trabajo de tesis doctoral hemos intentado entender mejor el papel de esta enzima en la biología celular de los progenitores del cuerpo carotídeo. Nuestros datos sugieren que neprilisina controla la diferenciación endotelial de una subpoblación de progenitores mesectodérmicos del CB, manteniendo a estas células “en reposo” gracias a la degradación de citoquinas pro-

angiogénicas, retrasando de esta forma la angiogénesis. Estas observaciones son compatibles con la función anti-angiogénica de CD10 descrita en córnea de ratón (Goodman et al., 2006) o en tejido pulmonar (Karoo et al., 2013), en este último ejemplo incluso en situación hipóxica (Dempsey et al., 2009). Sin embargo, generalmente la hipoxia tiene un efecto inhibitor de la expresión de CD10, un paso esencial para poder activar la angiogénesis (Carpenter y Stenmark, 2001; Mitra et al., 2013).

En el caso del CB, nuestro trabajo demuestra que CD10 juega un papel relevante en la regulación de la proliferación y la diferenciación de las células madre del órgano. Tanto la disminución de la actividad enzimática, mediante el uso de inhibidores específicos, como la bajada de la expresión de CD10, mediante el uso de siRNAs, producen un aumento en la diferenciación endotelial de los progenitores CD10⁺. Este resultado indica que cuando CD10 está activo regula la diferenciación hacia endotelio en los progenitores de CB, ralentizándola, con la consiguiente inhibición de la angiogénesis. Probablemente sea necesaria una disminución clara en la función de CD10 para que las células CD10⁺ maduren hacia endotelio, lo que se consigue gracias a la bajada en el número de células positivas y la disminución en la expresión de CD10 observadas cuando se exponen las ratas a hipoxia crónica. Por tanto, los experimentos realizados muestran que la hipoxia, un factor clave en la activación del nicho del CB, disminuye de manera significativa la expresión y por ende la función de CD10. En consecuencia, hipotetizamos que la hipoxia está implicada en la activación de los progenitores CD10⁺, disparando de esta forma el proceso angiogénico. En otros tejidos, la expresión de CD10 disminuye durante hipoxia debido a la regulación a nivel transcripcional que ejerce HIF1- α sobre el promotor de CD10 (Mitra et al., 2013). El factor de transcripción HIF1- α se une a las regiones reguladoras HRE 2 y 3 (del inglés *hypoxia responsive elements*) presentes en el promotor de CD10 (Mitra et al., 2013). La bajada en la expresión de CD10 provocada por la hipoxia conlleva la sensibilización de las células CD10⁺ hacia determinados péptidos. La disminución de la función de CD10 se traduce en una menor degradación de diversos péptidos, entre ellos citoquinas pro-proliferativas y pro-angiogénicas (Goodman et al., 2006; Horiguchi et al., 2008). Nuestros resultados sugieren que en condiciones de normoxia los progenitores CD10⁺ se mantienen insensibles hacia estas citoquinas pro-angiogénicas y pro-proliferativas. Sin embargo, la llegada del estímulo hipóxico provoca una bajada en la expresión de

CD10, y esto hace que los progenitores CD10⁺ se vuelvan más sensibles a las citoquinas liberadas en el nicho. Como consecuencia, estos progenitores se activan y se diferencian hacia células del linaje mesectodérmico (Figura 27).

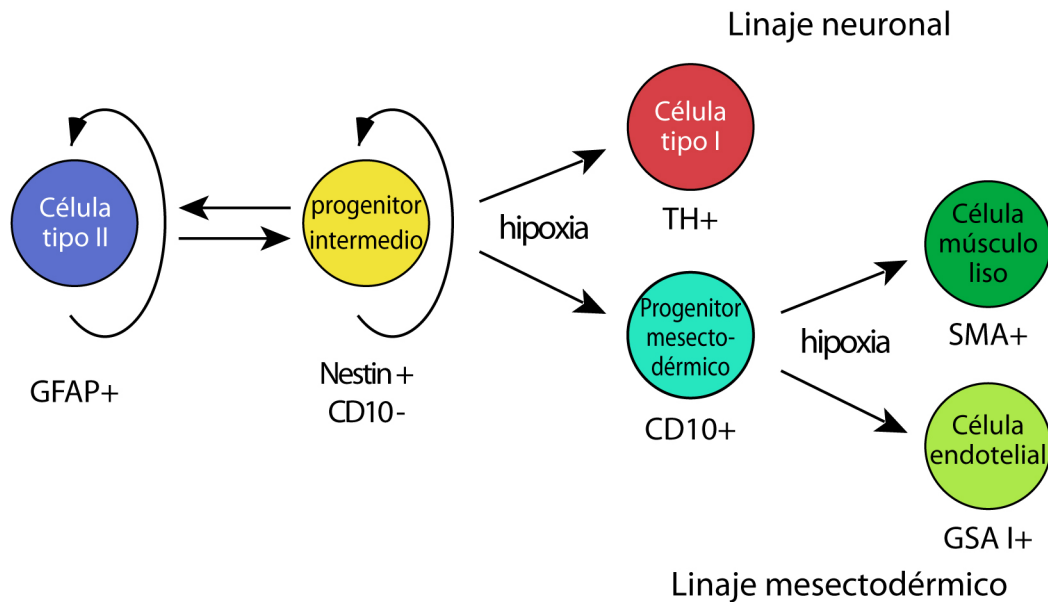


Figura 27. Modelo de la línea germinal de la célula madre del cuerpo carotídeo. Diagrama de la célula madre del cuerpo carotídeo (GFAP⁺) y sus linajes derivados: linaje neuronal y mesectodérmico.

De manera paralela a la neurogénesis, en el CB tienen lugar procesos de angiogénesis primordiales para la aclimatación del órgano a la hipoxemia (Annese et al., submitted; Chen et al., 2007a; Wang and Bisgard, 2002). La activación y diferenciación de los progenitores CD10⁺ podría contribuir a esta angiogénesis adaptativa del órgano. La acción de CD10 como regulador de la angiogénesis se ha descrito en otros tejidos (Goodman et al., 2006; Horiguchi et al., 2008), pero no se había estudiado en el CB. En células del epitelio prostático, neprilisina inactiva catalíticamente diversos péptidos señalizadores, y la pérdida de CD10 en estas células está asociada con el crecimiento y la progresión del cáncer de próstata, así como con un incremento en la angiogénesis (Mitra et al., 2013). La hipoxia, comúnmente asociada al ambiente del tumor, regula la expresión de CD10 disminuyéndola (Carpenter y Stenmark, 2001; Mitra et al., 2013). En un microambiente de células cancerosas, esta bajada de CD10 favorece la angiogénesis en el tumor, generando el consecuente crecimiento del mismo (Mitra et al., 2013). Nuestros resultados muestran que el estímulo hipóxico reduce los niveles de CD10 en células de CB *in vivo* e *in vitro*, sensibilizando a los progenitores CD10⁺ al aumento de citoquinas pro-angiogénicas que

tiene lugar en el microambiente extracelular del nicho en estas condiciones hipóxicas. De manera similar a lo que ocurre en un ambiente tumorigénico, la disminución observada en la función de CD10 en el CB podría contribuir a la angiogénesis del órgano, favoreciendo la adaptación de éste a la hipoxia crónica.

La exposición de las células a hipoxia crónica altera la expresión de una gran variedad de genes y su respuesta adaptativa está mediada por factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF1- α y sus isoformas) (Semenza, 2004). En el cuerpo carotídeo, HIF1- α forma parte del sistema que se activa en hipoxia, pero no está directamente involucrado en la detección aguda de los niveles de O₂, sino en los cambios plásticos en la actividad quimiosensora (respuesta ventilatoria aumentada y facilitación) que ocurren en el órgano a largo plazo (Kline et al., 2002; Peng et al., 2006). Asumiendo que en el CB la regulación de CD10 está mediada por HIF1- α , los resultados de esta tesis doctoral sugieren que, además de los cambios adaptativos en el parénquima neuronal, HIF1- α estaría regulando también cambios en la diferenciación de progenitores mesectodérmicos hacia células vasculares durante un estímulo hipóxico mantenido. Por tanto, el factor HIF1- α funcionaría como regulador general de la respuesta adaptativa del órgano a la hipoxemia, controlando tanto la adaptación quimiorreceptora neural como la angiogénica.

Paralelamente a su función catalítica, CD10 puede mediar diversos eventos de señalización intracelular a través de su asociación con diversas proteínas, como la subunidad p85 de la PI3K o la fosfatasa PTEN. Estas asociaciones permiten a CD10 intervenir en procesos de proliferación, diferenciación o migración celular, entre otros (Maguer-Satta et al., 2011b). Aunque el silenciamiento génico de CD10 realizado en células de CB afecta a la señalización intracelular de esta proteína, no se ha profundizado en los mecanismos intracelulares específicos por los que CD10 interviene en este tipo de procesos. No obstante, representan una parte funcional que sería interesante estudiar en futuros experimentos.

3. La ET-1 activa a los progenitores mesectodérmicos CD10⁺ para su diferenciación hacia células vasculares

El péptido endotelina-1 es un factor proliferativo que participa en el ensanchamiento de las paredes vasculares inducido por hipoxia, la hipertensión pulmonar, y la hipertrofia cardíaca (Bonvallet et al., 1994; Eddahibi et al., 1995; Oparil et al., 1995). La ET-1 está igualmente implicada en la especificación y migración de progenitores de la cresta neural (Bonano et al., 2008; Shin et al., 1999). En el cuerpo carotídeo, las células glómicas liberan ET-1 en respuesta a hipoxia, y este factor ejerce un papel mediador en la sinapsis formada entre la célula tipo I y la célula madre, provocando la activación proliferativa de estas últimas (Platero-Luengo et al., 2014a). Esta citoquina está también implicada en la inducción de la angiogénesis que tiene lugar en el CB durante hipoxia (Chen et al., 2007a), pues es liberada también por las células endoteliales cuando disminuyen los niveles de oxígeno. Resultados recientes de nuestro grupo muestran que varios factores vasculares, entre los que se encuentra la endotelina, promueven la diferenciación endotelial de los progenitores de CB *in vitro* (Annese et al., en revisión). La ET-1 también actúa junto con factores de crecimiento específicos promoviendo el ciclo celular en fibroblastos y células de músculo liso vascular en otros órganos (Rubanyi y Polokoff, 1994). Al igual que en otros nichos de células madre, la vasculatura juega un papel esencial en el CB (Annese et al., en revisión; Ramírez-Castillejo et al., 2006; Shen et al., 2008). Durante la exposición a hipoxia crónica, la red de vasos que envuelve a los glomérulos del CB sufre una angiogénesis que acompaña al aumento del parénquima neural experimentado por el órgano (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014a). De manera adicional a las células glómicas, las células endoteliales de los vasos liberan varios factores pro-angiogénicos, entre ellos la endotelina-1 (Chen et al., 2007a; Platero-Luengo et al., 2014a), que contribuirán a la progresión de la angiogénesis.

La ET-1 es uno de los principales sustratos de CD10 (Karoor et al., 2013; Maguer-Satta et al., 2011a; Mitra et al., 2013; Rubanyi y Polokoff, 1994; Turner y Tanzawa, 1997). La proteína CD10 degrada péptidos activos (Bachelard-Cascales et al., 2010; Maguer-Satta et al., 2011a; Roques et al., 1980; Turner y Tanzawa, 1997), como el FGF-2 o la ET-1, e impide así que estos lleven a cabo su efecto a través de sus receptores de membrana. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que CD10, presente en una subpoblación de progenitores mesectodérmicos del nicho del

CB, juega un papel importante en la diferenciación endotelial de estas células. En concreto, diversos experimentos funcionales han mostrado que el dominio enzimático de CD10 es una pieza clave en la regulación que ejerce esta proteína. La hipoxia induce la liberación rápida de ET-1 por las células neuronales, y de forma algo más lenta por las células vasculares. Nuestros resultados sugieren que ET-1 está activando a los progenitores CD10⁺ del CB, gracias a que la hipoxia disminuye en paralelo la función de la endopeptidasa de membrana. Quedaría por aclarar si la fuente que libera esta citoquina hacia los progenitores CD10⁺ son las células neuronales o el nicho vascular, aunque muy probablemente ambas fuentes sean importantes. Los datos sugieren también que ET-1 podría estar igualmente induciendo a algunas células madre multipotentes del CB a diferenciarse hacia progenitores mesectodérmicos CD10⁺. Esta diferenciación mesectodérmica se activa en el órgano con la llegada del estímulo hipóxico, una situación en la que tiene lugar un aumento de la liberación de ET-1. Una hipótesis para entender el curso temporal de activación de los progenitores CD10⁺ podría ser que primero reciben la ET-1 liberada por las células glómicas, y una vez activados, continuarían su diferenciación hacia células endoteliales maduras en respuesta a la ET-1 liberada por los vasos, contribuyendo de esta forma a la angiogénesis que tiene lugar en el órgano. Resultados anteriores de nuestro grupo confirman que en hipoxia el CB sufre un claro aumento del número de vasos sanguíneos y de células endoteliales CD31⁺ (Platero-Luengo et al., 2014a). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral, los progenitores CD10⁺, al diferenciarse, dejarían de expresar CD10 en la membrana, para comenzar a expresar marcadores endoteliales. En concordancia con esta hipótesis, la bajada de células CD10⁺ durante hipoxia coincide con el incremento de células CD31⁺ en el CB, es decir, los progenitores mesectodérmicos están madurando y completando su diferenciación hacia células endoteliales que formarán parte de los nuevos vasos sanguíneos generados.

Resultados obtenidos por nuestro grupo (Platero-Luengo et al., 2014a) demuestran que las células glómicas son los reguladores principales de la fisiología del CB, ya que son responsables tanto de la quimiorrecepción aguda (a corto plazo) como de la adaptación crónica (a largo plazo) del órgano, pues inducen a las células madre a participar en neurogénesis y angiogénesis. Hemos descrito características moleculares específicas de las CBSCs desconocidas hasta ahora, y hemos revelado un mecanismo

celular específico por el que estas células llevan a cabo angiogénesis. Los resultados obtenidos muestran que ET-1 induce la diferenciación de las CBSCs hacia el linaje mesectodérmico, a través del aumento de la población de células CD10⁺. Nuestros resultados apoyan la existencia de una función adicional a la neurogénica para la célula madre del CB, siendo éstas responsables de la adaptación angiogénica del órgano a la hipoxemia mantenida, a través de la activación de una subpoblación de progenitores mesectodérmicos que permanecen en estado latente en el nicho hasta que se precise su diferenciación para dar lugar a nuevos vasos sanguíneos. El estímulo que activa a estos progenitores sería directamente la hipoxia, mediante la inhibición de la función de CD10, junto a la presencia de citoquinas pro-angiogénicas como la ET-1. De esta forma, nuestros datos ayudan a comprender los procesos celulares que tienen lugar en el nicho germinal del CB, mediante los cuales las células madre participan tanto en neurogénesis como en angiogénesis, en respuesta al estímulo hipóxico. Un mejor conocimiento de los mecanismos que utiliza la célula madre del CB para decidir entre un linaje u otro, puede aportar importantes avances para el uso de estas células en terapia celular frente a enfermedades neurodegenerativas.

4. Aplicaciones en medicina

Las células madre de la cresta neural presentan una gran plasticidad durante el desarrollo embrionario (Le Douarin et al., 2008), especificándose a diversos linajes dependiendo de su posición rostro-caudal. La región cefálica (craneal y vagal) es más plástica que las partes troncal y sacral (LaBonne y Bronner-Fraser, 1998). Algunas NCSCs, como las CBSCs, persisten en el organismo adulto y pueden diferenciarse hacia células del linaje neuronal y del linaje mesectodérmico (Annese et al., en revisión; Pardal et al., 2007). Esta capacidad podría hacerlas especialmente interesantes desde el punto de vista de la terapia celular. El cuerpo carotídeo se ha utilizado satisfactoriamente para el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de Parkinson en modelos animales (Toledo-Aral et al., 2003; Villadiego et al., 2005). Dada la naturaleza

dopaminérgica de las células neuronales derivadas del CB, y la secreción de factores tróficos por parte de estas células, este tejido posee un gran potencial para contrarrestar el progreso de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Muñoz-Manchado et al., 2013; Ortega-Sáenz et al., 2013; Toledo-Aral et al., 2003). Sin embargo, la aplicación clínica de esta técnica está dificultada por el pequeño volumen, y por tanto bajo número de células neuronales, que presenta el cuerpo carotídeo humano (Arjona et al., 2003; Mínguez-Castellanos et al., 2007). La presencia de células madre en el CB ofrece una oportunidad para la expansión *in vitro* y la obtención de biomasa suficiente de células neuronales para los trasplantes (Lopez-Barneo et al., 2009). El uso de este tipo de células madre del CB para terapia celular anti-parkinsoniana requiere por tanto de un profundo conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan la biología y el comportamiento de estas células.

Datos previos de nuestro grupo de investigación ayudan a entender los mecanismos de diferenciación neuronal de las células madre del CB a nivel celular y molecular (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014a). Sin embargo, la diferenciación de las CBSCs hacia el linaje mesectodérmico está menos estudiada, en parte debido a la falta de marcadores que permitan aislar a las células de este linaje a partir del nicho del CB. La caracterización de CD10 como marcador de este linaje supone un gran avance, puesto que ha permitido aislar progenitores especificados hacia este linaje mesectodérmico del CB, y también nos ha proporcionado las primeras pistas sobre los mecanismos moleculares que permiten el progreso a lo largo de este linaje. Nuestros datos indican que la especificación de la célula madre hacia progenitores neuronales o mesectodérmicos ocurre en un estadio anterior a la expresión de CD10. Entender qué mecanismos intervienen en estas “decisiones” de las células madre es clave para conseguir manipular la diferenciación y la proliferación de estas células, y así desarrollar estrategias que permitan optimizar la obtención de células neuronales, y no mesectodérmicas, para su uso en terapia celular anti-parkinsoniana. La elaboración de mecanismos de inhibición mesectodérmica en las células madre del CB podría ser de gran interés, ya que hasta ahora no se han podido encontrar estrategias que induzcan claramente el linaje neuronal. En cualquier caso, en los trasplantes cerebrales también es necesaria una vascularización que permita la supervivencia del trasplante, vascularización que podría verse favorecida por la diferenciación endotelial de los progenitores del CB. Por tanto, se requieren experimentos adicionales con trasplantes

para determinar la verdadera utilidad de la capacidad de diferenciación mesectodérmica de las CBSCs en el tratamiento de los síntomas del Parkinson.

El estudio del papel de CD10 en la regulación de la diferenciación endotelial tiene gran relevancia en terapias anti-tumorigénicas (Goodman et al., 2006; Horiguchi et al., 2008), y podría ser utilizado como diana para generar estrategias que modulen la angiogénesis asociada al tumor. Asimismo, debido a la expresión de CD10 en células madre cancerosas en algunos tumores (Fukusumi et al., 2014), y a la asociación que existe entre CD10 y metástasis (Maguer-Satta et al., 2011a), la ampliación de nuestro conocimiento sobre CD10 en un nicho de células madre como es el CB, podría ser de gran utilidad para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Una disminución de la función de CD10 por hipoxia también afecta a la enfermedad de Alzheimer, pues la proteína CD10 es una de las metaloendopeptidasas degradadoras del péptido amiloide A β (Fisk et al., 2007; Iwata et al., 2000; Nalivaeva et al., 2004). Los estudios sobre la función reguladora de CD10 en distintos sistemas, como por ejemplo el presente trabajo en cuerpo carotídeo, pueden contribuir al conocimiento del papel catalítico de esta endopeptidasa en esta otra enfermedad neurodegenerativa.

Conclusiones

Conclusiones

- CD10 es un marcador específico que permite la identificación y el aislamiento de una subpoblación de progenitores del cuerpo carotídeo.
- Las células CD10⁺ derivan de la célula madre GFAP⁺ del cuerpo carotídeo.
- Los progenitores CD10⁺ están restringidos hacia el linaje mesectodérmico, siendo capaces de diferenciarse hacia células de músculo liso y endotelio, pero no hacia células neuronales.
- Los progenitores CD10⁺ se activan en hipoxia, en parte gracias a la disminución de la expresión de CD10.
- La proteína CD10 actúa como regulador de la angiogénesis en el cuerpo carotídeo a través de su actividad catalítica.
- La función reguladora de la diferenciación endotelial de CD10 se realiza mediante la degradación de endotelina-1, entre otros péptidos señalizadores pro-angiogénicos liberados en el nicho.
- La endotelina-1 favorece la diferenciación mesectodérmica de los progenitores del cuerpo carotídeo, confiriendo a las neuroesferas de este órgano un perfil de expresión génica compatible con este linaje.

Bibliografia

Bibliografía

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., M., R., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn (New York).

Allen, E. (1912). The cessation of mitosis in the central nervous system of albino rat. *J Comp Neurol* 19, 547-568.

Altman, J. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 128, 431-473.

Altman, J., and Das, G. D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953-956.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137, 433-457.

Álvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634.

Álvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., and Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2, 287-293.

Álvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973.

Annese, V., Navarro-Guerrero, E., and Pardal, R. (en revisión). Neural crest-derived stem cells in the adult mammalian carotid body differentiate into neural and vascular cell types in response to hypoxia. In.

Arias-Stella, J., and Valcarcel, J. (1976). Chief cell hyperplasia in the human carotid body at high altitudes; physiologic and pathologic significance. *Hum Pathol* 7, 361-373.

Arjona, V., Minguez-Castellanos, A., Montoro, R. J., Ortega, A., Escamilla, F., Toledo-Aral, J. J., Pardal, R., Mendez-Ferrer, S., Martin, J. M., Perez, M., *et al.* (2003). Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 53, 321-328; discussion 328-330.

Atherton, A. J., Anbazhagan, R., Monaghan, P., Bartek, J., and Gusterson, B. A. (1994). Immunolocalisation of cell surface peptidases in the developing human breast. *Differentiation* 56, 101-106.

Bachelard-Cascales, E., Chapellier, M., Delay, E., Pochon, G., Voeltzel, T., Puisieux, A., Caron de Fromentel, C., and Maguer-Satta, V. (2010). The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem Cells* 28, 1081-1088.

- Baggiolini, A., Varum, S., Mateos, J. M., Bettosini, D., John, N., Bonalli, M., Ziegler, U., Dimou, L., Clevers, H., Furrer, R., and Sommer, L. (2015). Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell* 16, 314-322.
- Bankston, P. W., Porter, G. A., Milici, A. J., and Palade, G. E. (1991). Differential and specific labeling of epithelial and vascular endothelial cells of the rat lung by *Lycopersicon esculentum* and *Griffonia simplicifolia* I lectins. *Eur J Cell Biol* 54, 187-195.
- Baroffio, A., Dupin, E., and Le Douarin, N. M. (1988). Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5325-5329.
- Baroffio, A., Dupin, E., and Le Douarin, N. M. (1991). Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development* 112, 301-305.
- Becker, A. J., Mc, C. E., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D. C., *et al.* (2010). In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 744-758.
- Bernard, A., and Boumsell, L. (1984). The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum Immunol* 11, 1-10.
- Bin-Jaliah, I., Maskell, P. D., and Kumar, P. (2004). Indirect sensing of insulin-induced hypoglycaemia by the carotid body in the rat. *J Physiol* 556, 255-266.
- Bisgard, G. E. (2000). Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respir Physiol* 121, 237-246.
- Bixby, S., Kruger, G. M., Mosher, J. T., Joseph, N. M., and Morrison, S. J. (2002). Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 35, 643-656.
- Blau, H. M., Brazelton, T. R., and Weimann, J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105, 829-841.
- Bonano, M., Tribulo, C., De Calisto, J., Marchant, L., Sanchez, S. S., Mayor, R., and Aybar, M. J. (2008). A new role for the Endothelin-1/Endothelin-A receptor signaling during early neural crest specification. *Dev Biol* 323, 114-129.
- Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C., and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9, 2110-2117.
- Bonvallet, S. T., Zamora, M. R., Hasunuma, K., Sato, K., Hanasato, N., Anderson, D., and Stelzner, T. J. (1994). BQ123, an ETA-receptor antagonist, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol* 266, H1327-1331.

- Bovetti, S., Hsieh, Y. C., Bovolin, P., Perroteau, I., Kazunori, T., and Puche, A. C. (2007). Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27, 5976-5980.
- Briones, A. M., Gonzalez, J. M., Somoza, B., Giraldo, J., Daly, C. J., Vila, E., Gonzalez, M. C., McGrath, J. C., and Arribas, S. M. (2003). Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* 552, 185-195.
- Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. (1989). Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron* 3, 755-766.
- Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1988). Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335, 161-164.
- Buckler, K. J., and Vaughan-Jones, R. D. (1998). Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *J Physiol* 513 (Pt 3), 819-833.
- Buhring, H. J., Battula, V. L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., and Vogel, W. (2007). Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 262-271.
- Cameron, H. A., and McKay, R. (1998). Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 8, 677-680.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.
- Cantley, L. C., and Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4240-4245.
- Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.
- Carlén, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M. S., Naldini, L., *et al.* (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12, 259-267.
- Carpenter, T. C., and Stenmark, K. R. (2001). Hypoxia decreases lung neprilysin expression and increases pulmonary vascular leak. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L941-948.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Jr., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P., and Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127, 1671-1679.

- Chell, J. M., and Frisén, J. (2012). Noisy neurons keep neural stem cells quiet. *Cell Stem Cell* 11, 282-284.
- Chelly, N., Henrion, A., Pinteaur, C., Chailley-Heu, B., and Bourbon, J. R. (2001). Role of keratinocyte growth factor in the control of surfactant synthesis by fetal lung mesenchyme. *Endocrinology* 142, 1814-1819.
- Chen, J., Dinger, B., Jyung, R., Stensaas, L., and Fidone, S. (2003). Altered expression of vascular endothelial growth factor and FLK-1 receptor in chronically hypoxic rat carotid body. *Adv Exp Med Biol* 536, 583-591.
- Chen, J., He, L., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2002). Role of endothelin and endothelin A-type receptor in adaptation of the carotid body to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L1314-1323.
- Chen, J., He, L., Liu, X., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2007a). Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on chronic hypoxia-induced morphological and physiological changes in rat carotid body. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1257-1262.
- Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K., and Chiquet, M. (1988). Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53, 383-390.
- Chojnacki, A. K., Mak, G. K., and Weiss, S. (2009). Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci* 10, 153-163.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A. R., Deleo, A. M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82, 545-559.
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Salani, S., Del Bo, R., Ghezzi, S., Strazzer, S., *et al.* (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp Neurol* 205, 547-562.
- Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J. C., Hutnick, L., Krueger, R. C., Jr., Fan, G., *et al.* (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1026-1031.
- D'Adamio, L., Shipp, M. A., Masteller, E. L., and Reinherz, E. L. (1989). Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7103-7107.
- David, C., Bischoff, L., Meudal, H., Mothe, A., De Mota, N., DaNascimento, S., Llorens-Cortes, C., Fournie-Zaluski, M. C., and Roques, B. P. (1999). Investigation of subsite preferences in aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) led to the design of the first highly potent and selective inhibitors of this enzyme. *J Med Chem* 42, 5197-5211.
- Degen, M., Brellier, F., Schenk, S., Driscoll, R., Zaman, K., Stupp, R., Tornillo, L., Terracciano, L., Chiquet-Ehrismann, R., Ruegg, C., and Seelentag, W. (2008).

Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 122, 2454-2461.

Dempsey, E. C., Wick, M. J., Karoor, V., Barr, E. J., Tallman, D. W., Wehling, C. A., Walchak, S. J., Laudi, S., Le, M., Oka, M., *et al.* (2009). Neprilysin null mice develop exaggerated pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia. *Am J Pathol* 174, 782-796.

Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Le Moual, H., Seidah, N. G., Chretien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., and *et al.* (1987). Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J* 6, 1317-1322.

Dexter, T. M., Allen, T. D., and Lajtha, L. G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91, 335-344.

Doetsch, F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6, 1127-1134.

Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14895-14900.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.

Doetsch, F., and Scharff, C. (2001). Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav Evol* 58, 306-322.

Doetsch F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Doetsch F., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11619-11624.

Duchen, M. R., Caddy, K. W., Kirby, G. C., Patterson, D. L., Ponte, J., and Biscoe, T. J. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* 26, 291-311.

Dumont, C. E., Muff, R., Fluhmann, B., Fischer, J. A., and Born, W. (2002). Paracrine/autocrine function of adrenomedullin in peripheral nerves of rats. *Brain Res* 955, 64-71.

Dupin, E., Calloni, G. W., and Le Douarin, N. M. (2010). The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. *Cell Cycle* 9, 238-249.

Dupin, E., and Le Douarin, N. M. (2014). The neural crest, A multifaceted structure of the vertebrates. *Birth Defects Res C Embryo Today*.

- Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol* 366, 83-95.
- Eddahibi, S., Raffestin, B., Clozel, M., Levame, M., and Adnot, S. (1995). Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am J Physiol* 268, H828-835.
- Edwards, C., Heath, D., and Harris, P. (1970). The carotid body in myocardial hypertrophy and pulmonary emphysema. *J Pathol* 101, P2-3.
- Erdos, E. G., and Skidgel, R. A. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 3, 145-151.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Evergren, E., Benfenati, F., and Shupliakov, O. (2007). The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone. *Journal of neuroscience research* 85, 2648-2656.
- Fidone, S. J., and González, C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body, (Washintong, DC).
- Fisk, L., Nalivaeva, N. N., Boyle, J. P., Peers, C. S., and Turner, A. J. (2007). Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. *Neurochem Res* 32, 1741-1748.
- Fitzgerald, R. S., Shirahata, M., Chang, I., and Kostuk, E. (2009). The impact of hypoxia and low glucose on the release of acetylcholine and ATP from the incubated cat carotid body. *Brain Res* 1270, 39-44.
- Fu, H. W., and Casey, P. J. (1999). Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. *Recent Prog Horm Res* 54, 315-342; discussion 342-313.
- Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., *et al.* (2014). CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 111, 506-514.
- Gage, F. H. (1998). Stem cells of the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 8, 671-676.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Gage, F. H., Ray, J., and Fisher, L. J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18, 159-192.
- Gallego-Martin, T., Fernández-Martínez, S., Rigual, R., Obeso, A., and Gonzalez, C. (2004). Effects of low glucose on carotid body chemoreceptor cell activity studied in

- cultures of intact organs and in dissociated cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C1128-1140.
- Galy, A., Morel, F., Hill, B., and Chen, B. P. (1998). Hematopoietic progenitor cells of lymphocytes and dendritic cells. *J Immunother* 21, 132-141.
- García, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., and Sofroniew, M. V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7, 1233-1241.
- García-Fernández, M., Ortega-Saenz, P., Castellano, A., and López-Barneo, J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* 56, 2893-2900.
- Goldman, S. A., and Chen, Z. (2011). Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain. *Nat Neurosci* 14, 1382-1389.
- Goodman, O. B., Jr., Febbraio, M., Simantov, R., Zheng, R., Shen, R., Silverstein, R. L., and Nanus, D. M. (2006). Neprilysin inhibits angiogenesis via proteolysis of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 281, 33597-33605.
- Grasemann, H., Lu, B., Jiao, A., Boudreau, J., Gerard, N. P., and De Sanctis, G. T. (1999). Targeted deletion of the neutral endopeptidase gene alters ventilatory responses to acute hypoxia in mice. *J Appl Physiol* (1985) 87, 1266-1271.
- Greaves, M. F., Brown, G., Rapson, N. T., and Lister, T. A. (1975). Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol* 4, 67-84.
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., Galli, R., Verdugo, J. M., Herrera, D. G., and Vescovi, A. L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22, 437-445.
- Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1, 67-73.
- Hagedorn, L., Suter, U., and Sommer, L. (1999). P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Development* 126, 3781-3794.
- Hamilton, A. (1901). The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat. . *J Comp Neurol* 11, 297-320.
- Harris, M. L., and Erickson, C. A. (2007). Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 1-19.
- Helisalmi, S., Hiltunen, M., Vepsäläinen, S., Iivonen, S., Mannermaa, A., Lehtovirta, M., Koivisto, A. M., Alafuzoff, I., and Soininen, H. (2004). Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 1746-1748.

- Hempleman, S. C., and Warburton, S. J. (2013). Comparative embryology of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 185, 3-8.
- Henion, P. D., and Weston, J. A. (1997). Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124, 4351-4359.
- Hoggatt, J., Singh, P., Sampath, J., and Pelus, L. M. (2009). Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 113, 5444-5455.
- Horiguchi, A., Chen, D. Y., Goodman, O. B., Jr., Zheng, R., Shen, R., Guan, H., Hersh, L. B., and Nanus, D. M. (2008). Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer tumorigenesis by reducing FGF-2-mediated angiogenesis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11, 79-87.
- Iijima-Ando, K., Hearn, S. A., Granger, L., Shenton, C., Gatt, A., Chiang, H. C., Hakker, I., Zhong, Y., and Iijima, K. (2008). Overexpression of neprilysin reduces alzheimer amyloid-beta42 (Abeta42)-induced neuron loss and intraneuronal Abeta42 deposits but causes a reduction in cAMP-responsive element-binding protein-mediated transcription, age-dependent axon pathology, and premature death in *Drosophila*. *J Biol Chem* 283, 19066-19076.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T. C. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nature medicine* 6, 143-150.
- Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P., and Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.
- Johnson, A. R., Ashton, J., Schulz, W. W., and Erdos, E. G. (1985). Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *Am Rev Respir Dis* 132, 564-568.
- Johnson, A. R., Skidgel, R. A., Gafford, J. T., and Erdos, E. G. (1984). Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides* 5, 789-796.
- Kameda, Y. (1996). Immunoelectron microscopic localization of vimentin in sustentacular cells of the carotid body and the adrenal medulla of guinea pigs. *J Histochem Cytochem* 44, 1439-1449.
- Kameda, Y. (2002). Carotid body and glomus cells distributed in the wall of the common carotid artery in the bird. *Microsc Res Tech* 59, 196-206.
- Kameda, Y. (2005). Mash1 is required for glomus cell formation in the mouse carotid body. *Dev Biol* 283, 128-139.

- Kameda, Y., Nishimaki, T., Takeichi, M., and Chisaka, O. (2002). Homeobox gene *hoxa3* is essential for the formation of the carotid body in the mouse embryos. *Dev Biol* 247, 197-209.
- Kameda, Y., Saitoh, T., Nemoto, N., Katoh, T., and Iseki, S. (2012). *Hes1* is required for the development of the superior cervical ganglion of sympathetic trunk and the carotid body. *Dev Dyn* 241, 1289-1300.
- Kameda, Y., Yamatsu, Y., Kameya, T., and Frankfurter, A. (1994). Glomus cell differentiation in the carotid body region of chick embryos studied by neuron-specific class III beta-tubulin isotype and Leu-7 monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 348, 531-543.
- KamedaY (2005). *Mash1* is required for glomus cell formation in the mouse carotid body. *Dev Biol* 283, 128-139.
- Kaplan, M. S., and Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094.
- Karoor, V., Oka, M., Walchak, S. J., Hersh, L. B., Miller, Y. E., and Dempsey, E. C. (2013). Neprilysin regulates pulmonary artery smooth muscle cell phenotype through a platelet-derived growth factor receptor-dependent mechanism. *Hypertension* 61, 921-930.
- Kenny, A. J., O'Hare, M. J., and Gusterson, B. A. (1989). Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation. *Lancet* 2, 785-787.
- Kerr, M. A., and Kenny, A. J. (1974a). The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 137, 477-488.
- Kioussi, C., and Matsas, R. (1991). Endopeptidase-24.11, a cell-surface peptidase of central nervous system neurons, is expressed by Schwann cells in the pig peripheral nervous system. *J Neurochem* 57, 431-440.
- Kline, D. D., Peng, Y. J., Manalo, D. J., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. (2002). Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 821-826.
- Knecht, W., Cottrell, G. S., Amadesi, S., Mohlin, J., Skaregarde, A., Gedda, K., Peterson, A., Chapman, K., Hollenberg, M. D., Vergnolle, N., and Bunnett, N. W. (2007). Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia. *J Biol Chem* 282, 26089-26100.
- Kondo, H. (1975). A light and electron microscopic study on the embryonic development of the rat carotid body. *Am J Anat* 144, 275-293.
- Kornack, D. R., and Rakic, P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294, 2127-2130.

- Krispin, S., Nitzan, E., Kassem, Y., and Kalcheim, C. (2010). Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. *Development* 137, 585-595.
- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S. J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35, 657-669.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-2033.
- Kumar, G. K. (1997). Peptidases of the peripheral chemoreceptors: biochemical, immunological, in vitro hydrolytic studies and electron microscopic analysis of neutral endopeptidase-like activity of the carotid body. *Brain Res* 748, 39-50.
- Kumar, G. K., Kou, Y. R., Overholt, J. L., and Prabhakar, N. R. (2000a). Involvement of substance P in neutral endopeptidase modulation of carotid body sensory responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 88, 195-202.
- Kumar, G. K., Oh, E. K., and Lee, M. S. (2000b). Interaction between catecholamines and neuropeptides in the carotid body: evidence for dopamine modulation of neutral endopeptidase activity. *Adv Exp Med Biol* 475, 507-515.
- Kumar, G. K., Runold, M., Ghai, R. D., Cherniack, N. S., and Prabhakar, N. R. (1990). Occurrence of neutral endopeptidase activity in the cat carotid body and its significance in chemoreception. *Brain Res* 517, 341-343.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiol* 36, 175-189.
- Lafrance, M. H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P., and Lemay, G. (1994). Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* 302 (Pt 2), 451-454.
- Laitinen, L. (1987). Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem J* 19, 225-234.
- Le Douarin, N., Le Lievre, C., and Fontaine, J. (1972). [Experimental research on the embryologic origin of the carotid body in birds]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 275, 583-586.
- Le Douarin, N. M. (1980). The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286, 663-669.
- Le Douarin, N. M., Calloni, G. W., and Dupin, E. (2008). The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* 7, 1013-1019.
- Le Lièvre, C. S., and Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34, 125-154.

- LeBien, T. W., and McCormack, R. T. (1989). The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)--emancipation from a functional enigma. *Blood* 73, 625-635.
- LeDouarin, N. M. (1986a). Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 231, 1515-1522.
- LeDouarin, N. M. (1986b). Investigations on the neural crest. Methodological aspects and recent advances. *Ann N Y Acad Sci* 486, 66-86.
- Leventhal, C., Rafii, S., Rafii, D., Shahar, A., and Goldman, S. A. (1999). Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13, 450-464.
- Levison, S. W., and Goldman, J. E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10, 201-212.
- Li, C., Booze, R. M., and Hersh, L. B. (1995). Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. *J Biol Chem* 270, 5723-5728.
- Li, H. Y., Say, E. H., and Zhou, X. F. (2007). Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* 25, 2053-2065.
- Lin, T. N., Kim, G. M., Chen, J. J., Cheung, W. M., He, Y. Y., and Hsu, C. Y. (2003). Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34, 177-186.
- Lois, A. F., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1993). The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J Bacteriol* 175, 1103-1109.
- López-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* 13, 493-499.
- López-Barneo, J., López-López, J. R., Ureña, J., and González, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241, 580-582.
- López-Barneo, J., Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Pascual, A., and Piruat, J. I. (2008). Carotid body oxygen sensing. *Eur Respir J* 32, 1386-1398.
- López-Barneo, J., Pardal, R., and Ortega-Saenz, P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 63, 259-287.
- Lopez-Barneo, J., Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., Villadiego, J., and Toledo-Aral, J. J. (2009). The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *Journal of neural transmission* 116, 975-982.
- Lord, B. I., Testa, N. G., and Hendry, J. H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* 46, 65-72.

- Lotz, M. M., Burdsal, C. A., Erickson, H. P., and McClay, D. R. (1989). Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 109, 1795-1805.
- Louissaint, A., Jr., Rao, S., Leventhal, C., and Goldman, S. A. (2002). Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34, 945-960.
- Luque, J. M., and Gimenez y Ribotta, M. (2004). Neural stem cells and the quest for restorative neurology. *Histol Histopathol* 19, 271-280.
- Macías, D., Fernández-Agüera, M. C., Bonilla-Henao, V., and López-Barneo, J. (2014). Deletion of the von Hippel-Lindau gene causes sympathoadrenal cell death and impairs chemoreceptor-mediated adaptation to hypoxia. *EMBO Mol Med* 6, 1577-1592.
- Maguer-Satta, V., Besancon, R., and Bachelard-Cascales, E. (2011a). Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells* 29, 389-396.
- Maguer-Satta, V., Chapellier, M., Delay, E., and Bachelard-Cascales, E. (2011b). CD10: a tool to crack the role of stem cells in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1264; author reply E1265.
- Malfroy, B., Kuang, W. J., Seeburg, P. H., Mason, A. J., and Schofield, P. R. (1988). Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* 229, 206-210.
- Malfroy, B., Schofield, P. R., Kuang, W. J., Seeburg, P. H., Mason, A. J., and Henzel, W. J. (1987). Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 144, 59-66.
- Malfroy, B., Swerts, J. P., Guyon, A., Roques, B. P., and Schwartz, J. C. (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276, 523-526.
- Marcel, D., Pollard, H., Verroust, P., Schwartz, J. C., and Beaudet, A. (1990). Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (EC 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat. *J Neurosci* 10, 2804-2817.
- Marshall, C. A., and Goldman, J. E. (2002). Subpallial dlx2-expressing cells give rise to astrocytes and oligodendrocytes in the cerebral cortex and white matter. *J Neurosci* 22, 9821-9830.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Matsas, R., Kenny, A. J., and Turner, A. J. (1986). An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. *Neuroscience* 18, 991-1012.

- McCoy, E. M., Hong, H., Pruitt, H. C., and Feng, X. (2013). IL-11 produced by breast cancer cells augments osteoclastogenesis by sustaining the pool of osteoclast progenitor cells. *BMC Cancer* 13, 16.
- McGregor, K. H., Gil, J., and Lahiri, S. (1984). A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 57, 1430-1438.
- McKinney, M. C., Fukatsu, K., Morrison, J., McLennan, R., Bronner, M. E., and Kulesa, P. M. (2013). Evidence for dynamic rearrangements but lack of fate or position restrictions in premigratory avian trunk neural crest. *Development* 140, 820-830.
- Mínguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G. R., Toledo-Aral, J. J., Ortega-Moreno, A., Méndez-Ferrer, S., Martín-Linares, J. M., Katati, M. J., Mir, P., Villadiego, J., *et al.* (2007). Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 825-831.
- Mitra, R., Chao, O. S., Nanus, D. M., and Goodman, O. B., Jr. (2013). Negative regulation of NEP expression by hypoxia. *Prostate* 73, 706-714.
- Montoro, R. J., Ureña, J., Fernández-Chacón, R., Álvarez de Toledo, G., and López-Barneo, J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* 107, 133-143.
- Morrison, S. J., Uchida, N., and Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 35-71.
- Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C., and Anderson, D. J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737-749.
- Muff, R., Born, W., and Fischer, J. A. (2001). Adrenomedullin and related peptides: receptors and accessory proteins. *Peptides* 22, 1765-1772.
- Mumford, R. A., Pierzchala, P. A., Strauss, A. W., and Zimmerman, M. (1981). Purification of a membrane-bound metalloendopeptidase from porcine kidney that degrades peptide hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6623-6627.
- Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Garrido-Gil, P., Labandeira-Garcia, J. L., Echevarria, M., López-Barneo, J., and Toledo-Aral, J. J. (2013). Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 34, 902-915.
- Musa, M., Wilson, K., Sun, L., Mulay, A., Bingle, L., Marriott, H. M., LeClair, E. E., and Bingle, C. D. (2012). Differential localisation of BPIFA1 (SPLUNC1) and BPIFB1 (LPLUNC1) in the nasal and oral cavities of mice. *Cell and tissue research* 350, 455-464.
- Nagae, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Mori, K., Yahata, K., Kasahara, M., Suganami, T., Makino, H., Fujinaga, Y., Yoshioka, T., *et al.* (2000). Rat receptor-

activity-modifying proteins (RAMPs) for adrenomedullin/CGRP receptor: cloning and upregulation in obstructive nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 89-93.

Nagoshi, N., Shibata, S., Kubota, Y., Nakamura, M., Nagai, Y., Satoh, E., Morikawa, S., Okada, Y., Mabuchi, Y., Katoh, H., *et al.* (2008). Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2, 392-403.

Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., and Baron-Van Evercooren, A. (2008). The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 265, 26-31.

Nalivaeva, N. N., Fisk, L., Kochkina, E. G., Plesneva, S. A., Zhuravin, I. A., Babusikova, E., Dobrota, D., and Turner, A. J. (2004). Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1035, 21-33.

Ohab, J. J., Fleming, S., Blesch, A., and Carmichael, S. T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26, 13007-13016.

Oliver, K. R., Kane, S. A., Salvatore, C. A., Mallee, J. J., Kinsey, A. M., Koblan, K. S., Keyvan-Fouladi, N., Heavens, R. P., Wainwright, A., Jacobson, M., *et al.* (2001). Cloning, characterization and central nervous system distribution of receptor activity modifying proteins in the rat. *Eur J Neurosci* 14, 618-628.

Oparil, S., Chen, S. J., Meng, Q. C., Elton, T. S., Yano, M., and Chen, Y. F. (1995). Endothelin-A receptor antagonist prevents acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat. *Am J Physiol* 268, L95-100.

Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Levitsky, K., Villadiego, J., Muñoz-Manchado, A. B., Durán, R., Bonilla-Henao, V., Arias-Mayenco, I., Sobrino, V., Ordoñez, A., *et al.* (2013). Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J Physiol* 591, 6157-6173.

Palmer, T. D., Takahashi, J., and Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8, 389-404.

Palmer, T. D., Willhoite, A. R., and Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425, 479-494.

Pardal, R., and López-Barneo, J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* 5, 197-198.

Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Durán, R., and López-Barneo, J. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131, 364-377.

Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., Platero-Luengo, A., and Lopez-Barneo, J. (2010). The carotid body, a neurogenic niche in the adult peripheral nervous system. *Arch Ital Biol* 148, 95-105.

- Pardal, R., and Platero-Luengo, A. (2011). A pathophysiological view of the neural stem cell niche. In *Stem Cell, Regenerative Medicine and Cancer*, S.R. Singh, ed. (New York: Nova Science Publishers, Inc.), pp. 141-156.
- Pearse, A. G., Polak, J. M., Rost, F. W., Fontaine, J., Le Lievre, C., and Le Douarin, N. (1973). Demonstration of the neural crest origin of type I (APUD) cells in the avian carotid body, using a cytochemical marker system. *Histochemie* 34, 191-203.
- Peers, C., and Buckler, K. J. (1995). Transduction of chemostimuli by the type I carotid body cell. *J Membr Biol* 144, 1-9.
- Peers, C., and Green, F. K. (1991). Inhibition of Ca(2+)-activated K⁺ currents by intracellular acidosis in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *J Physiol* 437, 589-602.
- Peng, Y. J., Yuan, G., Ramakrishnan, D., Sharma, S. D., Bosch-Marce, M., Kumar, G. K., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. (2006). Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 577, 705-716.
- Petretto, E., Sarwar, R., Grieve, I., Lu, H., Kumaran, M. K., Muckett, P. J., Mangion, J., Schroen, B., Benson, M., Punjabi, P. P., *et al.* (2008). Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (Ogn) in the regulation of left ventricular mass. *Nat Genet* 40, 546-552.
- Platero-Luengo, A. (2014b) Hipertrofia del cuerpo carotídeo en hipoxia crónica: mecanismos de activación, proliferación y diferenciación de los progenitores neurales en el sistema nervioso periférico, University of Seville, Seville.
- Platero-Luengo, A., González-Granero, S., Durán, R., Díaz-Castro, B., Piruat, J. I., García-Verdugo, J. M., Pardal, R., and López-Barneo, J. (2014a). An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell* 156, 291-303.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. C., and Melton, D. A. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298, 597-600.
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Farinas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9, 331-339.
- Ramón y Cajal, S., ed. (1913). *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso*, (Madrid: Imprenta de hijos de Nicolás Moyá).
- Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Richarte, A. M., Mead, H. B., and Tallquist, M. D. (2007). Cooperation between the PDGF receptors in cardiac neural crest cell migration. *Developmental Biology* 306, 785-796.

Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M. C., Soroca, E., Lecomte, J. M., Malfroy, B., Llorens, C., and Schwartz, J. C. (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288, 286-288.

Roques, B. P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M. C., and Beaumont, A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45, 87-146.

Rubanyi, G. M., and Polokoff, M. A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46, 325-415.

Rush, R. S., and Hersh, L. B. (1982). Multiple molecular forms of rat brain enkephalinase. *Life Sci* 31, 445-451.

Saito, D., Takase, Y., Murai, H., and Takahashi, Y. (2012). The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science* 336, 1578-1581.

Salles, G., Rodewald, H. R., Chin, B. S., Reinherz, E. L., and Shipp, M. A. (1993). Inhibition of CD10/neutral endopeptidase 24.11 promotes B-cell reconstitution and maturation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7618-7622.

Sanders, J. E., Baker, A. B., and Golledge, S. L. (2002). Control of in vivo microvessel ingrowth by modulation of biomaterial local architecture and chemistry. *J Biomed Mater Res* 60, 36-43.

Scadden, D. T. (2014). Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* 157, 41-50.

Scherberich, A., Tucker, R. P., Samandari, E., Brown-Luedi, M., Martin, D., and Chiquet-Ehrismann, R. (2004). Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *Journal of cell science* 117, 571-581.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.

Semenza, G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19, 176-182.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21, 7153-7160.

Seri, B., Herrera, D. G., Gritti, A., Ferron, S., Collado, L., Vescovi, A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1, i103-111.

Shah, N. M., Groves, A. K., and Anderson, D. J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-343.

- Sharin, V. G., Mujoo, K., Kots, A. Y., Martin, E., Murad, F., and Sharina, I. G. (2011). Nitric oxide receptor soluble guanylyl cyclase undergoes splicing regulation in differentiating human embryonic cells. *Stem Cells Dev* 20, 1287-1293.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S. M., Goderie, S. K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289-300.
- Shi, H., Cui, H., Alam, G., Gunning, W. T., Nestor, A., Giovannucci, D., Zhang, M., and Ding, H. F. (2008). Nestin expression defines both glial and neuronal progenitors in postnatal sympathetic ganglia. *J Comp Neurol* 508, 867-878.
- Shin, M. K., Levorse, J. M., Ingram, R. S., and Tilghman, S. M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402, 496-501.
- Shipp, M. A., Stefano, G. B., Switzer, S. N., Griffin, J. D., and Reinherz, E. L. (1991). CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood* 78, 1834-1841.
- Shipp, M. A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E. V., Masteller, E. L., D'Adamio, L., Hersch, L. B., and Reinherz, E. L. (1989). Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 297-301.
- Smith, P., Gosney, J., Heath, D., and Burnett, H. (1990). The occurrence and distribution of certain polypeptides within the human carotid body. *Cell Tissue Res* 261, 565-571.
- Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M. S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Gotz, M., Barker, P. A., *et al.* (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29, 4172-4188.
- Soriano, P. (1997). The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124, 2691-2700.
- Sotelo, J. R., and Trujillo-Cenoz, O. (1958). Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 49, 1-12.
- Stea, A., and Nurse, C. A. (1991). Whole-cell and perforated-patch recordings from O2-sensitive rat carotid body cells grown in short- and long-term culture. *Pflugers Arch* 418, 93-101.
- Stemple, D. L., and Anderson, D. J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985.
- Stewart, S. M. (2004). *Stem Cells Handbook*, (New York: Human Press).

- Stingl, J., Raouf, A., Emerman, J. T., and Eaves, C. J. (2005). Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 49-59.
- Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G. L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298-310.
- Suh, H., Deng, W., and Gage, F. H. (2009). Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 253-275.
- Sumitomo, M., Shen, R., and Nanus, D. M. (2005). Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta* 1751, 52-59.
- Sunday, M. E., Hua, J., Torday, J. S., Reyes, B., and Shipp, M. A. (1992). CD10/neutral endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. Patterns of expression and modulation of peptide-mediated proliferation. *J Clin Invest* 90, 2517-2525.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J. M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.
- Temple, S., and Álvarez-Buylla, A. (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9, 135-141.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Till, J. E., and McCulloch, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Toledo-Aral, J. J., Mendez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarria, M., and Lopez-Barneo, J. (2003). Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* 23, 141-148.
- Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., *et al.* (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170, 1135-1146.
- Tong, Y., Tiplitsky, S. I., Tar, M., Melman, A., and Davies, K. P. (2008). Transcription of G-protein coupled receptors in corporeal smooth muscle is regulated by the endogenous neutral endopeptidase inhibitor sialorphan. *J Urol* 180, 760-766.
- Turner, A. J., and Tanzawa, K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 11, 355-364.
- Ureña, J., Fernández-Chacón, R., Benot, A. R., Álvarez de Toledo, G. A., and López-Barneo, J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal

dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10208-10211.

Vaghjiani, R. J., Talma, S., and Murphy, C. L. (2009). Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP1 and STEAP2)-differentially expressed by murine and human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 15, 2073-2083.

Villadiego, J., Méndez-Ferrer, S., Valdes-Sánchez, T., Silos-Santiago, I., Fariñas, I., López-Barneo, J., and Toledo-Aral, J. J. (2005). Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J Neurosci* 25, 4091-4098.

Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P., and Roques, B. P. (1986b). Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J* 5, 3163-3166.

Waldo, K., Zdanowicz, M., Burch, J., Kumiski, D. H., Stadt, H. A., Godt, R. E., Creazzo, T. L., and Kirby, M. L. (1999). A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J Clin Invest* 103, 1499-1507.

Wang, B. L., Sun, W., Shi, Z. C., Lou, J. N., Zhang, N. F., Shi, S. H., Guo, W. S., Cheng, L. M., Ye, L. Y., Zhang, W. J., and Li, Z. R. (2008). Decreased proliferation of mesenchymal stem cells in corticosteroid-induced osteonecrosis of femoral head. *Orthopedics* 31, 444.

Wang, H., Sun, M., Yang, H., Tian, X., Tong, Y., Zhou, T., Zhang, T., Fu, Y., Guo, X., Fan, D., *et al.* (2014). Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates up-regulation of neprilysin by histone deacetylase-1 under hypoxia condition in neuroblastoma cells. *J Neurochem* 131, 4-11.

Wang, Z., Yang, D., Zhang, X., Li, T., Li, J., Tang, Y., and Le, W. (2011). Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons. *PLoS One* 6, e19229.

Wang, Z. Y., and Bisgard, G. E. (2005). Postnatal growth of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 149, 181-190.

Wehrwein, E. A., Limberg, J. K., Taylor, J. L., Dube, S., Basu, A., Basu, R., Rizza, R. A., Curry, T. B., and Joyner, M. J. (2015). Effect of bilateral carotid body resection on the counterregulatory response to hypoglycaemia in humans. *Exp Physiol* 100, 69-78.

Weir, E. K., López-Barneo, J., Buckler, K. J., and Archer, S. L. (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 353, 2042-2055.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C., and Reynolds, B. A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609.

Weston, J. A., and Thiery, J. P. (2015). Pentimento: Neural Crest and the origin of mesectoderm. *Developmental Biology*.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.

Yan, G., Fukabori, Y., Nikolaropoulos, S., Wang, F., and McKeehan, W. L. (1992). Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Molecular endocrinology* 6, 2123-2128.

Yoo, J., Kim, H. S., and Hwang, D. Y. (2013). Stem cells as promising therapeutic options for neurological disorders. *J Cell Biochem* 114, 743-753.

Yu, L., Tu, Q., Han, Q., Zhang, L., Sui, L., Zheng, L., Meng, S., Tang, Y., Xuan, D., Zhang, J., *et al.* (2015). Adiponectin regulates bone marrow mesenchymal stem cell niche through a unique signal transduction pathway: an approach for treating bone disease in diabetes. *Stem Cells* 33, 240-252.

Zhang, M., Buttigieg, J., and Nurse, C. A. (2007). Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *J Physiol* 578, 735-750.